Orientia tsutsugamushi の毒力決定因子および感染宿主応答に関する研究

2006 年

福原 正博

目次

目次　・・・

序　論

1. 恙虫病

恙虫病は発熱と発疹を伴う感染症で、ツツガムシと呼ばれるダニの幼虫によって媒介される。この感染症は新潟、山形、秋田地方の地方病として発見され、その病原体の発見も日本人によってなされた(1, 2)。病原細菌の学名は *Rickettsia tsutsugamushi* と呼ばれていたが、1995 年に新属 *Orientia* が設けられ、*Orientia tsutsugamushi*（以下 Ot と省略）となった（3)。

古くから日本海側に発生する一地方病と考えられていた恙虫病は、1945 年には東南アジアを始めとして、西はパキスタン地方、北はロシア極東から朝鮮半島、中国など、広く東半球に分布する広域感染症であることが明らかにされた。日本国内でも 1946 年に富士山麓の米軍キャンプで演習中の兵士に患者が発生したのを端緒に、この感染症が東北、北陸に限らず全国的に発生していることが明らかになった。古くから知られていた新潟、山形、秋田県の恙虫病は 7〜8 月の盛夏に発生し、感染は河川流域に限られていた。ツツガムシは幼虫期にのみヒトや小動物を刺すが、これは媒介種と考えられるアカツツガムシ幼虫の発生時期と生息域を反映している。この恙虫病は抗生物質の無かった戦前では致死率が 20%にも上った。それに対し、全国的に発生していることが戦後明らかとなった恙虫病はフトゲまたはタテツツガムシ媒介と考えられており、春と秋から初冬にかけて田畑、山林などで患者が発生し、前者が「古典型」と呼ばれるのに対し、「新型」と呼ばれている（4)。新型恙虫病も古くから発生していたと思われるが、病原性が弱くほとんど死者が出なかったため、古典型ほどの注目を集めなかったものと考えられる。恙虫病は、死者が出るほど重症になる場合があるが、流行地域内の住民では血清中に抗 Ot 抗体は検出されるものの、症状も既往歴も見られない例も多く、不顕性感染が示唆されている。

2. ツツガムシと Ot の関係

日本国内には、100 種以上のツツガムシが生息している。広汎な研究によれば、Ot を保有するツツガムシは日本国内では十数種である（5)。それらのうち、ヒトへの寄生性をもつ種はアカツツガムシ、フトゲツツガムシ、タテツツガムシの 3 種が主たるものであり（5)、それぞれのおおよその Ot 保有率はアカツツガムシ、2%、フトゲツツガムシ、0.3%、タテツツガムシ、0.03%であると推定されている(5, 6)。Takahashi 等（7）は Ot 媒介種の一つであるフトゲツツガムシの生活史を明らかにしている。卵から孵ったツツガムシは変態に必要な栄養を得る

ために、一度だけ野鼠などの温血動物に吸着する。吸着した幼虫は唾液腺より消化液を注入し、宿主組織を溶解した後、溶解した組織を含んだ体液を吸入する(8, 9)。この消化液を注入する時、唾液腺中の Ot が宿主に移行する。２～４日間吸着した幼虫は満腹して宿主より脱落し、土中に戻る。続いて休止状態(第一若虫)を経て変態し、再び活動性の第二若虫となった後、土中の昆虫卵などを餌として成長し、再び休止期(第三若虫)を経て、成虫となる。野鼠、ヒトに Ot を伝播するツツガムシは、卵を介した垂直伝播により常に Ot を保有している有毒なものに限られる。温血動物への吸着は一度だけなので、ツツガムシを介しての野鼠からヒトへの伝播はない。ツツガムシは Ot を保有しても死なないので（10)、ツツガムシと Ot は共生関係にあるということができる。従って、ツツガムシはベクターであると同時にリザーバーでもある。

3. 発生状況

恙虫病の患者数は大きく増減している。第二次大戦前では多い年で年間 400 名の患者が記録されており、1950 年頃、年間 100 名程度となってから減少し、1970 年をはさむ前後 10 年余りの間は 10 名前後になった。それが 1970 年代後半から患者数が急激に増加し、1980 年から現在までの 20 年間は毎年約 400 から 800 人の恙虫病患者が届けられている。この間、死者は年間 2-3 人である。この増加に伴い患者発生地は広域化し、かつては東北、北陸地方に限られていたものが、現在では沖縄と北海道を除く全国で発生している。そして現在最も多くの患者の発生を見るのは、南九州地方である。なぜ 1970 年代後半から恙虫病が急増したかについては諸説ある。患者数は数十年周期で増減を繰り返しているようにも見え、何らかの理由で恙虫病の発生には周期性があると推察する研究者もいる（6)。その一方で、患者数が増加に転じた時期は、感染症を疑われる熱性疾患に対する処方薬が、テトラサイクリン、クロラムフェニコールなど恙虫病に著効のある抗生物質からβ-ラクタム系をはじめとする恙虫病には全く効力のないものに替わった時期に当たり、患者数の増減は見かけ上のものとする考察もある（11)。

4. 臨床症状

恙虫病の臨床症状は、ツツガムシに刺されてから 10 日前後の潜伏期を経て、全身倦怠、食欲不振、高度の頭痛、悪寒などのインフルエンザ様の症状に始ま

り、体温が上昇し、38-40℃になる。発熱後数日で発疹が体幹、顔面などに現れる。重症の場合は、中枢神経症状、循環器障害を起こし、死亡することがある。ツツガムシに刺された箇所には、恙虫病に特徴的な赤味のある痂皮形成が認められ、診断の決め手となる。ほかの検査データとしては、白血球数は減少傾向を示し、異形リンパ球も見られる。CRP は強陽性となり、GOT、GPT は上昇、血小板は減少する。

治療には、ドキシサイクリン、ミノサイクリンなどのテトラサイクリン系の抗生物質が著効を示す。この他にマクロライド系やクロラムフェニコールが有効であるが、β-ラクタム系、アミノグリコシド系は全く効果がない。これは Ot にペプチドグリカンが欠如していることを反映している。

5. 診断法

恙虫病の確定診断は、患者血清中の特異抗体を免疫蛍光抗体法、免疫ペルオキシターゼ抗体法（12）などによって検出する方法が一般的である。これらは感度､精度ともに優れた方法である｡最近では PCR 法による患者血液 (buffy coat) からの Ot 遺伝子の検出も確定診断に用いられ、感度の高さから高い評価を得ている。Weil-Felix 反応は、*Orientia* 属が *Proteus* 属との間に共通抗原を持っていることに基礎をおいており、*Proteus mirabilis* OXK 株を抗原として、恙虫病患者の血清による凝集反応の有無で判断する。この検査法は手技も単純で高価な機器を必要としないため、東南アジアでは未だに広く用いられているが、基本的には非特異反応であるため、信頼性が低い。

6. 培養と精製方法

Ot は偏性寄生性であるため、培養には宿主が必要である。従来からマウス腹腔内接種法、発育鶏卵の卵黄嚢内接種法が用いられたが、鶏の胚の初代培養細胞や培養細胞系である L929、HeLa、Vero、BHK 細胞などが使用される。こうした培養細胞系を使用して患者または自然界から Ot を分離することも可能である (13)。

また、Otの感染価測定法としてマウスを用いたLD_{50}法や、他に鶏の胚の初代培養細胞（14）や培養細胞系（15, 16）を用いたプラック計数法があった。しかし、プラック法は技術的に熟練を要し、かつプラック形成に 2〜3 週間の培養期間が必要であるため、短期日で接種液の感染価を知ることができなかった。そ

こで、プラック法よりは精度が低いが、OtをL929 細胞に感染させ、染色法によって感染細胞を計数する簡便な感染価測定法も開発され（17)、本研究にも使用している。

菌体の精製法としては、*Rickettsia prowazekii* や *R. rickettsii* ではレノグラフィンを用いた密度勾配遠心法が確立されていた（18, 19）が、Ot は脆弱で表面が粘性に富むため、宿主細胞成分から分離し難い等の理由から、レノグラフィン法が使用できなかった。Tamura 等はパーコール密度勾配遠心法によって Ot の精製に成功した（20)。

7．Ot の侵入・増殖様式

Ot の L929 細胞内増殖機構については、電子顕微鏡を用いて詳細に観察されている(15, 21, 22, 23, 24, 25)。図 1 に Ot の細胞への侵入・増殖様式を示した。図中のアルファベットは各増殖ステップを示す。細胞に Ot を感染させると、細胞への接着（ステップ a）に続いて、ファゴサイトーシスにより、Ot はファゴソーム中に取り込まれる（ステップ b～c)。ここで Ot は二つの方向に分かれる。一つは Ot を包むファゴソームの膜が融解して（ステップ d)、Ot は細胞質中に放出され、2 分裂で増殖する（ステップ e)。一方、ファゴソーム中に取り込まれた一部の Ot（ステップ f）はファゴソーム中で不活化され、原形質分離を起こし、消化される（ステップ g、i、j)。原形質分離を起こした Ot は複数でファゴソーム中に取り込まれ（ステップｈ～i)、同様に細胞質内で処理される。ステップ a から e の侵入過程は、L929 細胞では約 10 分で進行する。Ot の

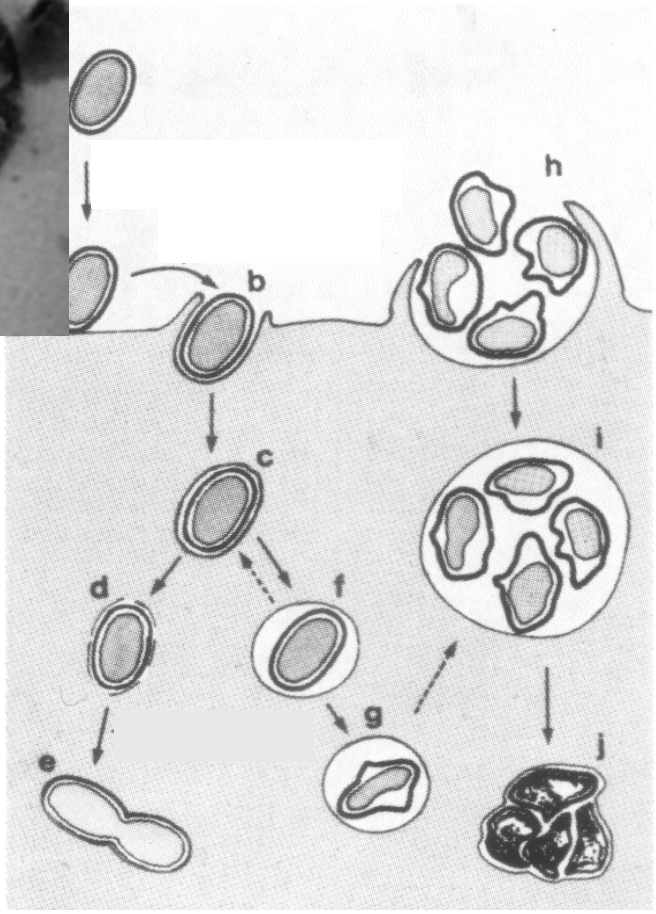


図 1　Ot の L929 細胞中での増殖様式（模式図）アルファベットは種々の増殖ステップにある Ot を示す

doubling time は L929 細胞系では 9〜10 時間であるが（15)、18 時間という報告もあり（16)、一般の細菌に比べて緩慢である。感染 4〜5 日には Ot は宿主細胞質内を埋め尽くすほど（100〜200 個/細胞）になり、細胞変性を起こさせる（図 2)。

内の Ot（ギムザ染

8．構造

Ot は偏性寄生性のグラム陰性細菌である。その大きさは一般に、幅 0.5〜0.8 μm、長さ 1.2〜3.0μm で、これはリケッチア属の場合の幅 0.25〜0.56μm、長さ 0.5〜2.5μm より大きい(26) 。電子顕微鏡による観察で、外側は細胞壁と細胞質膜に包まれ、ペリプラスム間隙は明瞭である。細胞質内は DNA 繊維の見られる核様体領域とリボソームが散在する細胞質領域が見られる (15)。Ot には莢膜は存在せず、*Rickettsia* 属で顕著な菌体周辺のハローも見られない (15) 。電子顕微鏡で見られる *Rickettsia* 属の微生物と Ot との形態上のもう一つの差異は、リケッチア属の場合、細胞壁の外層より内層の電子密度が高く見えるが、Ot の場合は逆に外層が濃く、内層が薄く見える (27)ことである。リケッチア属の微生物の外膜にはリポ多糖 (LPS) が存在し(28, 29)。またペプチドグリカンの構成成分であるムラミン酸やジアミノピメリン酸の存在が証明されている(30, 31)。これに対し、Ot は一般細菌類似のペプチドグリカンや LPS の構成成分であるムラミン酸、グルコサミン、ヘプトース、3-deoxy-D-mannoocutolosonic acid が検出されず、ヒドロキシ脂肪酸も欠落している(32)。

9．分類学上の位置

Ot はかつて発疹チフスや各種紅斑熱の病原体と同属のリケッチアとみなされ、*R. tsutsugamushi* と呼ばれてきた。しかし、Ot はペプチドグリカンや LPS を欠落し、構成蛋白構造に他のリケッチアと類似性が見られないという重要な表現型上の差異がある。そこで、Ot の分類学上の位置づけを確認するために、16SrRNA 遺伝子について、*Rickettsia* 属の菌との相同性を調べた結果(33)、抗原性を異にする Gilliam、Karp、Kato、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi の 16SrRNA 遺伝子の相

同性は 98.5%以上で１つのクラスターを形成した。一方リケッチア属の *R. prowazekii*、*R. typhi*、*R. rickettsii*、*R. sibirica* はそれぞれ 98.1%以上の相同性を示してクラスターを形成したが、そのクラスターと Ot のクラスターとの相同性は 90.2～90.5%で、両者間に明瞭な距離が認められた。上述したように Ot と他のリケッチア属のものの間には各種の表現型上の差異があり、且つ 16SrRNA 遺伝子の相同性においても大きな開きがあることから、Tamura 等は Ot を Genus *Rickettsia* から外し、別の Genus に配置換えすることが妥当と考え、*Orientia* という新属名を付し、*Orientia tsutsugamushi* と改名することを提唱した(34)。これが採用されて現在はこの命名が用いられるようになった。

10．本研究の目的

Ot は株間で抗原性が大きく異なり、これは *Rickettsia* 属の菌には見られない大きな特徴とされてきた。従来からビルマ（現ミヤンマー）で分離された Gilliam、ニューギニアで分離された Karp、日本の Kato の３株に代表される血清型の存在はよく知られており、この３株を標準株として、分離株の血清型別が行われてきた(35, 36)。しかし、1980 年代の流行に伴う弱毒株の分離法の導入で、我が国の患者分離株には Gilliam、Karp、Kato の３型のいずれにも属さない Kawasaki(37)、Kuroki(38)、および Shimokoshi（39）の新しい血清型が見出された。近年、Ot の型特異的抗原蛋白遺伝子による遺伝子型別、およびモノクローナル抗体を用いた型別を行った結果、原型である Gilliam、Karp 株と日本の Gilliam 型、Karp 型が異なっていることが明らかとなった（40)。このことから、日本での分離株は独立した型として分離され、それぞれ JG 型と JP 型と呼ばれるようになった。そして、現在では Kato、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi、JG、JP の 6 型に患者分離株は分けられている。

マウスは Ot に対し感受性を示すことが古くから知られ、患者やダニ、野鼠からの Ot 分離に際しては、試料をマウスの腹腔内に接種する方法が多用されてきた(41)。Gilliam、Karp、Kato の 3 株もこのようにして、患者から分離された株である。しかしその後、マウスに対し何らの症状を示さない弱毒性の株が見出され、こうした弱毒株の分離には免疫抑制剤であるシクロフォスファミドを投与したマウス(42)または培養細胞系が用いられるようになった(13)。その結果、患者から Kuroki、Kawasaki、Shimokoshi が分離された他、ダニおよび野鼠からも以上の 6 型とも異なる血清型の株が分離されるようになった。Gilliam、Karp、Kato

の 3 血清型の株をマウスに腹腔内接種したとき、そのマウスの多くは発症し死亡するのに対し、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi の 3 血清型の株やダニからの分離株を接種したとき、マウスは殆ど何の症状も起こさず生残する。この観察から、血清型とマウスに対する毒力との関連性が盛んに議論されてきた。Ot の血清型を決定する因子は、患者血清および株特異的モノクローナル抗体を用いた western blotting 法により、菌体表面に多量に存在する分子量 56kDa 蛋白であることが明らかとなっている（25, 43)。しかし、数十株の 56kDa のアミノ酸配列とそれぞれの株の毒力の強弱とには相関は見いだされず、マウスに対して毒力を発揮する因子については、未解明のままであった。

台湾の南に位置している澎湖島の恙虫病患者は、比較的軽症な場合が多い。また、1950 年に伊豆七島で七島熱と呼ばれた恙虫病の大量発生があったが、患者数 433 名中、死亡者は僅か 1 名であった（44)。その後、1976 年に三宅島、伊豆七島の健常人の血清から抗 Ot 抗体が検出されたが、抗体が検出された住民の全員に、過去 2 年間七島熱の症状がなく、且つ七島熱に罹患した経歴がなかった（45)。中国における血清学的調査でも、約 40%の住民から抗 Ot 抗体が検出され、抗 Ot 抗体を検出するものの全く症状がない場合がある（46)。これらのことから、ヒトに対する不顕性感染が広く存在すること、その原因となるヒトに対して病原性の低い Ot 株が存在することが示唆された。このような抗原性の強弱を解析するために、株ごとの毒力の違いが明瞭なマウスはヒトにおける Ot の強毒および弱毒株のモデルとして有用であると思われる。

Ot の感染に対するマウスの応答を分析した多くの報告がある。Ot は株ごとにマウスに対する毒力が異なるが、これはマウスの系統に依存しない。しかし、Gilliam は例外であり、大量に接種すると全てのマウスを殺すが、接種量を減らすとマウスの系統による差が現れてくる（47)。例えば、感染価を低くして接種すると、BALB/c マウスは死亡しないが、C3H マウスは死亡する（48)。この現象については遺伝子学的な解析が行われ、感受性の違いを支配するマウスの遺伝子は、サイトカインである early T-lymphocyte activation 1 の遺伝子上にマップされていることが明らかになっている（49, 50, 51)。Early T-lymphocyte activation 1 はマクロファージの遊走と殺菌活性に影響を及ぼす（51, 52)。

また、Gilliam に感染した BALB/c マウスから得た抗体を正常マウスに投与後、Karp を感染させると、マウスは死亡したが、Gilliam に感染したマウスの脾臓から得た T 細胞を正常なマウスに移入したとき、Karp に対して防御効果があった

（53）。この観察は、Ot に対する防御に、リンパ球が関与していることを示唆している。一方、マクロファージの重要性を示す観察も得られている。低感染価の Gilliam を接種したマウス腹腔には、活性化マクロファージが増加する（54）。また Gilliam の感染で生き残ったマウスから得られた活性化マクロファージに *in vitro* で Gilliam を感染させても、Gilliam は増殖しなかった（55）。また、BALB/c に Gilliam や Karp を接種したとき、マウスの腹腔内には、ケモカインやサイトカインが分泌されるが、Gilliam に比べ Karp を感染させたマウスの腹腔に、より多くのケモカイン類の分泌が見られ、この分泌が過剰であるため、マウスを死亡させることが示めされた（56）。これらのことから、Ot に対するマウスの防御には抗体よりもリンパ球やマクロファージ、そしてサイトカインを介した細胞性免疫が主に働いていることが示唆されている。

Ot の特徴である株ごとのマウスに対する毒力については、殆ど明らかになっていない。株による毒力の差異は、Ot そのものの違いだけでなく、感染によってケモカインやサイトカイン等が産生されるという宿主側の応答が関係すると考えられる。そこで、本研究では以下の３つの点に焦点を絞り、Ot の病原性に関して解析することを目的とした。第一に強毒株と弱毒株を感染させた時の宿主側の応答を、*in vivo*、*in vitro* の細胞レベル、特にマクロファージに注目して比較する。第二に感染によりマクロファージが産生するサイトカインなどの防御因子の合成、分泌をなるべく多くの Ot 株を用いて比較し、どのような因子がマクロファージ内で増殖の可否に関与しているかを検索する。第三に Ot の構成成分を分画してマクロファージに接種することで、Ot の毒力の物質的根拠を追究する。

第一章　*Orientia tsutsugamushi* の *in vivo*、*in vitro* のマウス細胞中での増殖と形態観察

Otは偏性寄生菌であり、宿主細胞の細胞質内でのみ増殖する。Otの感染に対してマウスは感受性を示すことが知られており、患者や自然界からの分離に際しては、試料をマウスの腹腔内に接種する方法が多用されてきた(41)。この方法によって、Karp、Gilliamなどのマウスを殺す強毒株が数多く分離された。その後、ヌードマウス(57)、や免疫抑制剤を投与したマウスが用いられるようになり（39）、Kuroki（38）、Kawasaki（37）などのヒトには毒力を示すものの、マウスに対しては弱毒性の株が分離されるようになった。患者およびツツガムシ、野鼠から数多くのOtが分離された結果、これらの分離株をマウス腹腔内に接種すると、マウスを死亡させる株と接種量を増やしてもマウスに殆ど症状を示させず生残させる株とにほぼ大別されることが明らかとなった（40）。このように毒力が株ごとに異なることが*Rickettsia*属などには認められないOtの特徴の一つであるが、なぜ毒力が異なるのかについては、殆ど明らかになっていない。

Ot 感染に対する宿主の応答に関しては、マウスを用いた研究が行われている。ある Ot の株に感染したマウスから抗 Ot 抗体と T 細胞を調製し、これらを別のマウスに移入した場合、抗体を移入されたマウスは、抗原性の異なる株の感染を阻止できなかったが、T 細胞を移入されたマウスは異なる株の感染にも抵抗性になることが示された（53）。また、ヌードマウスは Ot の感染に対して感受性である。Ot を感染させたマウスから T 細胞を採取した後、これをヌードマウスに移入すると、ヌードマウスは Ot の感染に対して抵抗性を示すようになった（57）。強毒株を腹腔内に接種されたマウスでは、その腹腔内に Ot に感染したマクロファージや単球が観察される。そして、感染後生残したマウスの腹腔内には活性化されたマクロファージが出現しており、これが他株の感染に対する抵抗性に関与している（54）。このような活性化マクロファージを取りだし *in vitro* で接種しても Ot は増殖せず（55）、正常マウスからのマクロファージとは異なる結果となった。また、低感染価の Gilliam を感染させることにより、BALB/c マウスは生残する。BALB/c マウスの常在マクロファージを *in vitro* で培養した後、Gilliam を感染させると、マクロファージ内で Gilliam は増殖することから、増殖抑制には *in vivo* の条件でマクロファージに影響を与える因子がある（48）。これらは、マウス腹腔内で Ot が増殖するか否かに関してマクロファージが重要な役割を果たすことを示している。以上の観察は、Ot の感染に対するマウスの防御機構は、主にリンパ球やマクロファージを介した細胞性免疫が重要であることを示唆している。

Otの増殖の場は宿主細胞の細胞質内である。Otが増殖するためには、宿主細胞に侵入しなければならない。哺乳類の細胞内へのOtの侵入過程は、マウス脾臓細胞（58)、モルモット好中球（59）とL929細胞（24）で観察されている。これらの全ての細胞でOtはファゴサイトーシスによってファゴソーム中に取り込まれ、ファゴソーム膜を融解して細胞質中に脱出することが明らかにされている。ファゴソームを脱出しなかった一部のOtは、ファゴリソゾームにより原形質分離を起こし消化されていくことが電子顕微鏡の観察で明らかになっている。この過程のうち、ファゴサイトーシスによる取り込み、ファゴソームからの脱出の効率に違いがあれば、Otの毒力の違いとなって現れる可能性がある。

Otの細胞内への侵入過程や感染に対するマウスの応答の解析には、Gilliam、Karpのような強毒株がよく用いられている。しかしOtには数多くの分離株があり、マウスを殆ど殺さない株も存在する。そこで本章では、強毒株としてKarpを、弱毒株としてKurokiを用い、これらをBALB/cマウスに接種し比較することで、株間で毒力が異なる理由を解析した。まず始めに、腹腔に集積する細胞を計数した。これら集積した細胞内での両株の増殖を光学および電子顕微鏡で観察した。そして、両株の違いをより詳細に解析するためにマウス腹腔内から調製したマクロファージを*in vitro*で培養し、Otを感染させたときのマウスの応答を細胞レベルで比較した。

1-1　材料と方法

宿主細胞

L929（マウス線維芽細胞）は 10%牛胎児血清（FBS)、150μg/mL ストレプトマイシン、100 単位/mL ペニシリンを含む Eagle's MEM (日水薬品 Co., LTD. Tokyo)中で静置培養した。

マウス腹腔滲出マクロファージは以下のように調製した。7～8 週齢の雌BALB/cマウス腹腔に 10% proteose peptone (Difco Lab., Detroit, MI. USA) 1 mlを接種した。3 日後、腹腔内にPBSを 10mL注入して腹腔洗浄液を採取した。それを 200×g、10 分間遠心して細胞を回収し、牛胎児血清（FBS）を 10%含有するD-MEM培地(Difco Lab., Detroit, MI. USA)に細胞数が 1×10^6個/mlとなるように再浮遊し、その 0.5 mlずつをLab-Tek 4 chamber slide（Nalge Nunc International, Naperville, IL. USA）の各wellで培養した。これを 5% CO_2培養器中で 37℃に一晩培養後、PBSで激しく洗浄して非付着細胞を除去し、スライド上に残存した付着

細胞を滲出マクロファージとして使用した。

Otの培養

Karp、Kurokiの培養はTamura et alの方法（60）に従いL929細胞中で培養した。

細胞内の平均Ot数が約100に到達した感染細胞を2%FBS含有イーグルMEMまたはD-MEMに浮遊させ、Dounceホモジナイザー(Kontes Glass Co., Vineland, NJ. USA)でホモジナイズした。ホモジネートは200×gで10分間遠心し、その上清を接種液として用いた。これをL929または滲出マクロファージ上に重層し、2時間吸着させた。吸着終了後、接種液を除き、細胞表面を培養液で2回洗浄し、新しい培養液を添加して培養を開始した。

Otの感染価測定およびマウスに対する毒性試験

感染価測定法は多村等による感染細胞計数（infected cell counting units: ICU）法によった（17)。まず、25cm^2のフラスコに単層培養したOt感染L929 細胞を剥離し、5mlのFBS不含MEM中で上記と同様にホモジネートを調製した。これを接種液原液とし、FBS不含MEMを用いて 10 倍段階希釈液を調製した。これらの0.25mlをchamber slideに培養したL929 細胞に感染させ 4 日間、5%CO_2存在下、37℃で培養した後、ギムザ染色して感染細胞数を計数し次式のようにICUを算出した。

ICU＝（感染細胞率）×（well 当たりの細胞数）×（接種液の希釈倍率）×（1/0.25）

LD_{50}の算出は、同じ接種液を 0.5mLずつ 7～8 週齢の雌BALB/cマウスに腹腔内接種した後、4 週間観察し行った（40)。

マウスへの感染実験

上述の毒性試験と同様に Karp または Kuroki をマウス腹腔内接種した。偽感染には Ot を含まない培地を接種した。接種後、任意の時間にマウス腹腔内に PBS を 10ml 投与し、腹腔洗浄液を回収した。回収液中の細胞数を血球計算盤で計数した。ギムザ染色法によって、回収液中のマクロファージ、好中球、リンパ球の割合を求めた。これらの細胞中の Ot 数を以下の 5 つのクラスに分類した上で、それぞれのクラスの細胞数を計数した。細胞当たりの Ot 数が 0、1～10、11～50、51～100、101 以上。それぞれの細胞腫で少なくとも 300 以上の細胞を観察し、各クラスに分類後、各クラスの細胞数にそれぞれのクラスでの Ot の平均値である 0、5、20、75、125 を乗じて集計し、全菌体数とした。

*In vitro*マウス腹腔滲出マクロファージへの感染実験

Chamber slide上に調製した滲出マクロファージに前述のOt接種液を 0.25ml接

種し、Otを 5%CO_2存在下、37℃で 2 時間吸着させた。吸着終了後、細胞表面を培養液で洗い、新しい培養液を 0.5ml添加して 5%CO_2存在下、37℃で培養した。任意の時間に培養液を除き、PBSで洗浄後、メタノールで 10 分間固定した。次にギムザ染色を行い、細胞を観察した。全菌体数の計数は前述のように行った。

電子顕微鏡観察

マウス腹腔内細胞と *in vitro* のマクロファージを電子顕微鏡用に固定した（60, 61)。細胞は 2%グルタールアルデヒドと 1%オスミウム酸 0.1M カコジル酸緩衝液（pH7.4）で固定した。その後、2%酢酸ウランで染色した。その後、エタノールで脱水し、Quentol-812（Nissin EM Co., Ltd, Tokyo）中に包埋した。超薄切片を鉛染色液（片山薬品工業社製）で染色した後、電子顕微鏡で観察した。

1-2　結果

1-2-1　マウス内での Ot の Karp および Kuroki 株の毒力

Karp と Kuroki 株の感染価と BALB/c マウスに対する毒力を表 1-1 に示した。

両株の接種液原液のICUをほぼ 10^6/mlに揃えたとき、Karpは接種液を 1000 倍希釈してもマウスは発症し、その後死亡した。一方、Kurokiは、接種液原液をマウスに接種してもマウスは何の症状も示さず、生残した。この結果は、Karpが強毒であり、Kurokiは弱毒であることを示している。

表 1-1　Ot 接種液の感染価とマウスに対する毒力

Strain	Inocula (ICU*/0.25ml)	LD_{50}**/0.25ml***	LD_{50}/ICU
Karp	2.25×10^6	5.62×10^3	2.20×10^{-3}
Kuroki	1.49×10^6	< 3.16×10^0	< 2.12×10^{-6}

*: 10% infectious dose in L929 cell culture.

**: 50% lethal dose in BALB/c mice.

***: L cells in a chanber and mice were received 0.25ml of inocula.

1-2-2　Ot 接種後のマウス腹腔内に集積する細胞とその細胞中での菌の増殖

ICU を同程度にした Karp および Kuroki をマウス腹腔に接種したときの腹腔内のマクロファージ、好中球、リンパ球の挙動を経時的に観察した（図 1-1A および B)。

Karp を接種したマウスの腹腔内では、マクロファージ、好中球、リンパ球の

数が顕著に増加した。マクロファージの数は感染 6 日目に非感染群の 30 倍に達し、感染 7 日目にマウスは死亡した。また、偽感染では殆ど見られない好中球が感染 1 日目以降に認められるようになり、その後、マウスの死亡直前まで直線的に増加した。観察期間の全てを通じて、リンパ球の数はマクロファージの約 30%程度であったが経時的に増加した（図 1-1A）。これらの細胞中の Karp を計数したところ、マクロファージ内では感染 0 日（3 時間）目から 6 日目まで対数的に増殖し、一細胞当たり数十個の Ot を認めるまでになった。好中球では、この細胞がはじめて腹腔内に認められた感染 1 日目には、Karp の感染は見られなかった。菌体は感染 2 日目から認められ、その後 3 日目から 6 日目まで対数的に増殖した（図 1-1C 実線）。しかし、リンパ球中には観察期間中を通じて菌体は認められなかった。

Kuroki 接種群では、感染 4 日目までマクロファージ数の上昇を認めたが、増加は Karp に比較して緩慢で、その後徐々に偽感染群レベルにまで減少した。感染 14 日目には、細胞数はほぼ正常値に戻り、マウスは生残した。好中球、リンパ球の数も偽感染に比べ増加したが、Karp 接種群と比較して少なかった（図 1-1B）。また、Karp 感染の場合に比較し、特に好中球は顕著に少ないことが判明した。腹腔内細胞で Kuroki が細胞中に認められたのはマクロファージのみであり、好中球とリンパ球では全く検出されなかった（図 1-1C 点線）。マクロファージ 1 細胞あたりの Kuroki 数は、感染 3 時間後では Karp と殆ど差がなかったが、Karp の対数的な増殖に対し、Kuroki はその後増えることはなく、感染 8 日目まで一定であった。その間マクロファージは 4 日目までに約 5 倍に増加した後、減少していった。即ち、Kuroki は感染 4 日目までは宿主であるマクロファージの増加と同程度に増加したものと思われる。しかし、マクロファージの減少と共に、Kuroki も感染 14 日目まで徐々に減少し、観察できなくなった。

以上の観察より、Ot の 2 株ともほぼ同数がマクロファージ中に侵入するが、侵入後、Karp は対数的に増殖するのに対し、Kuroki は一細胞あたりの数に変化がなく、マクロファージ数の増加程度しか増殖せず、最終的には除去されることが明らかとなった。そして、Karp は好中球内でも増殖するが、Kuroki 感染マウスでは、腹腔内に好中球の浸潤は認めるが、その中に菌体は認められなかった。好中球の役割を示唆する観察はなかったが、この観察事実は、Kuroki の排除は主にマクロファージによって行われていることを示唆している。

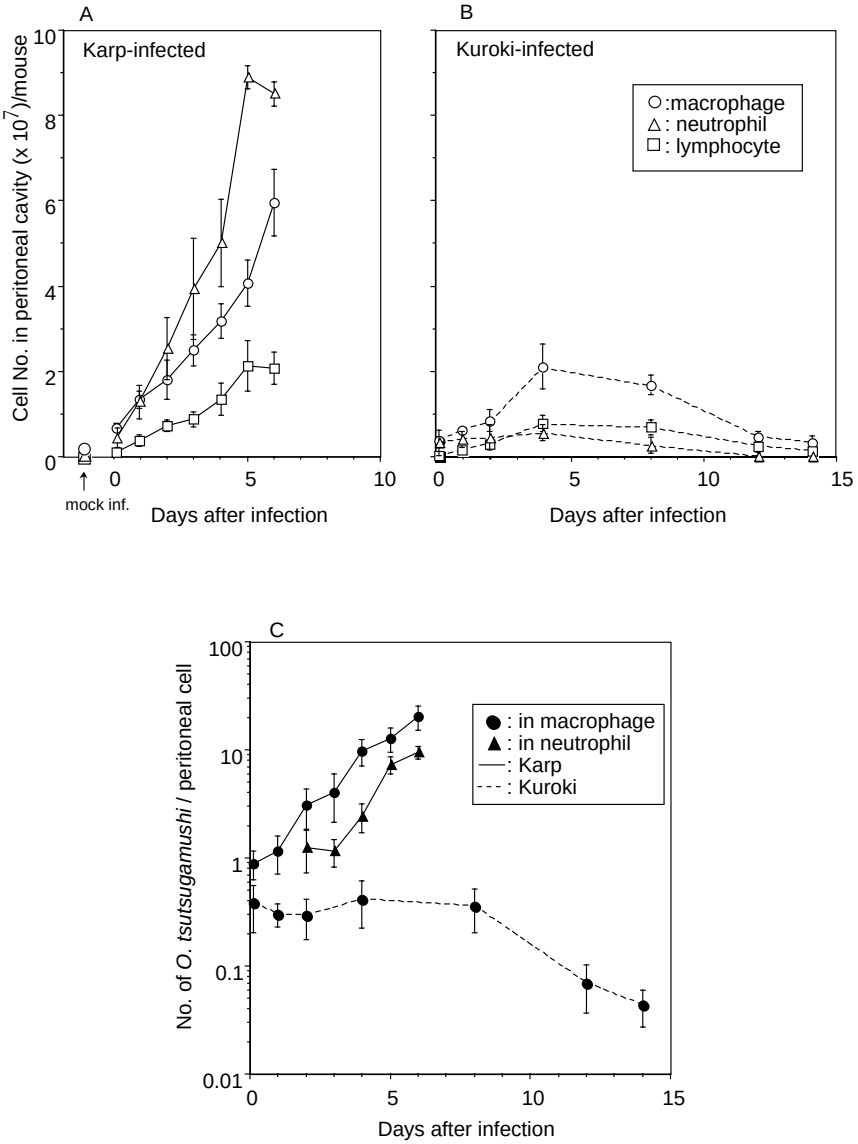


図 1-1　Ot の Karp と Kuroki 感染 BALB/c マウス腹腔内の細胞数と種類、および腹腔内細胞中の Ot の増殖

A: Karp 感染マウスの腹腔内細胞数、B: Kuroki 感染マウスの腹腔内細胞数で、○：マクロファージ、△：好中球、□：リンパ球を示す。C: 腹腔内細胞中での Karp（実線）、Kuroki（点線）の増殖で、●：マクロファージ中の菌数、▲：好中球中の菌数を示す。

1-2-3　*In vitro* のマウス滲出マクロファージへの Ot の感染

Karp および Kuroki に感染したマウスの観察から、Ot が増殖を続けるか、排除されるかについて、マクロファージが重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、*in vivo* ではマクロファージは、腹腔に浸潤してきた好中球、リンパ球など様々な細胞、および腹腔内の組織の影響を受けていると考えられる。

そこで、Ot 感染におけるマクロファージ自体の役割を解析するために、*in vitro* のマクロファージを調製し、Karp と Kuroki を感染させたときの菌体数を計数した。

図 1-2 に示すように、Karp と Kuroki は感染 1 日目のマクロファージ中でほぼ同数認められた。これは毒力が違うにも関わらず、細胞質内に侵入する効率が両株で同等だったことを示唆している。その後、Karp はマクロファージ中で対数的に増殖し、マクロファージは感染 6 日後に破壊された。一方、Kuroki は、マクロファージ中では増殖せず、感染 8 日後まで一定の数を保った。この実験成績は、*in vivo* での観察と同様であり、これが *in vitro* でも再現されたということは、マクロファージ内での Kuroki の増殖抑制と排除にマクロファージ以外の細胞や組織の関与は必須ではなく、マクロファージ単独で行いうることを示している。そして、この機構は Karp に感染したマクロファージでは機能しないものと考えられた。

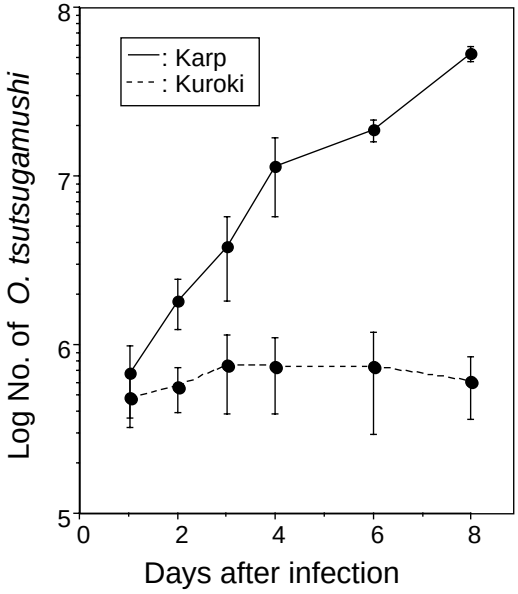


図 1-2　*In vitro* マウス腹腔滲出マクロファージ中の Karp（実線）
および Kuroki（点線）の増殖

1-2-4　腹腔内細胞中の Ot の電子顕微鏡的観察

Ot の宿主細胞質内への侵入過程は繊維芽細胞である L929 細胞で以下のように観察されている。最初に Ot は細胞表面に吸着し、ファゴサイトーシスによりファゴゾーム内に取り込まれる。そして取り込みから 10 分以内で Ot はファゴソーム膜を融解し、細胞質中に脱出する。しかし、ファゴソームに取り込まれ

たOtが全て細胞質中に脱出するのではなく、一部はファゴリソゾームにより殺菌され、原形質分離を起こした後、消化される。この過程で殺されるOtの数は、ファゴソーム中のOtを計数することで知ることができる。

今回*in vivo*でのOtの増殖と排除の過程を解析するため、電子顕微鏡を用いてKarpおよびKurokiに感染したマウスの腹腔内細胞を調べた。マウス腹腔内にほぼ10^6lCUの接種液を接種し、腹腔内の細胞を1時間後に回収した。これらの細胞はその形態から主にマクロファージであると考えられた。Otはこれらの細胞の細胞質だけでなく（図1-3A）、ファゴソーム中（図1-3B～D）でも認められた。細胞質中のOtが健全な形態のものばかりであったのに対して、ファゴソーム中のOtの多くは、明確な原形質分離をおこしていた（図1-3C、D）。原形質分離をおこしたOtは細胞質には殆ど見られないこと、L929細胞での観察（24）では、原形質分離を起こしたOtはファゴサイトーシスされないことから、これらのOtはファゴソームに取り込まれた後ファゴリソゾームによる殺菌を受けていると考えられた。また、リソソームの融合が（図1-3B矢印）Otを囲んでいるファゴソームで観察されることがあった。

QuickTimeý Ç²
TIFFÂiLZWÃj êLíÉÉvÉçÉOÉãÉÃ
Ç™Ç±ÇÃÉsÉNÉ`ÉÉÇ¾ã©ÇÉÇžÇ½Ç…ÇÖÍKóvÇ-Ç ÃB

図1-3　感染1時間後のマウス腹腔内マクロファージ中のOtの電子顕微鏡像
A: マクロファージ細胞質中のKarp、B; マクロファージファゴソーム中のKuroki、その形態は殆ど無傷であり、矢印はリソソームフュージョンをおこしている。C および D: ファゴソーム中で原形質分離を起こしているKarpとKuroki　　スケールは0.5μm。

表1-2　感染1時間後のマクロファージ中の0t分布と原形質分離の割合

strain of Ot injected	no. of bacteria (%)					average no. of	
	in cytoplasm		in phagosome		undefined*	bacteria examined	macrophages examined
	intact	plasmolyzed	intact	plasmolyzed			
Karp	86.2 ± 5.51**	0.3 ± 0.41	3.3 ±1.65	5.5 ± 2.66	2.2 ± 3.66	133	84.7
Kuroki	77.6 ± 11.47	0.2 ± 0.41	4.2 ±2.79	10.9 ± 9.61	7.0 ± 3.24	134	219.3

*: could not be defined either in cytoplasm or in phagosome on ultrathin sections.
**: average with standard error for 3 mice

Karp と Kuroki マクロファージ細胞質内での増殖の違いが侵入後のファゴソーム内での殺菌の差異を反映したものあるか否かを確認するため、感染したマクロファージの細胞質中とファゴソーム中の菌数を計数した（表 1-2）。その結果、Karp と Kuroki のそれぞれ 86%、77%が細胞質に脱出しており、その割合に有意な差はなかった。また、細胞質内に脱出し、原形質分離を起こしている菌は極く少数であった。更に Karp と Kuroki の間でファゴソーム中の原形質分離を起こす割合に有意な差は見出せなかった。この結果から、Karp と Kuroki のマクロファージ中での増殖の違いが、感染早期にファゴソーム中で殺される菌数の差によるものではないことが判明した。

続いて、KarpとKurokiとの間で、細胞質内への侵入後に差異が生じるかどうかを観察した。感染 1 日後にはKarpもKurokiもファゴソーム中に認められず、且つ形態的な差異はなかった。これは、すべての菌体がすでにファゴソームから脱出した、またはファゴソーム内で消化されたことを示している。10^6ICUのKarpを接種すると、マウスが 2 日で死亡してしまうため、Karpでは 10^5ICUを接種したマウスを用いた。1 日目以降もKarpは増殖を続け、マクロファージだけでなく好中球の細胞質中にも見られるようになり、1 細胞に数個以上のOtが観察されるようになった。（図 1-4A、B）。一方、10^6ICUのKurokiを接種したマウスでは、感染 1～2 日目には少数のマクロファージにのみ菌体が認められ（図 1-4C）、マクロファージ中のKurokiの数は細胞当たり 1 菌体であった。感染 2 日目以降になると菌数は減り始め、マクロファージ内にKurokiを見つけることは、10^6 ICUを接種したマウスの腹腔内細胞中でも困難になった。

そこで容易に感染率を高くできる *in vitro* で培養したマクロファージに感染させたところ、Kuroki はマクロファージ細胞質中で常に認められた。感染 2 日後では殆どの Kuroki が変形し（図 1-4D）、4 日後には殆ど全てが膨潤した形態をしていた（図 1-4E）。一方、同様に *in vitro* で感染させた Karp は、細胞質内でその数を増やし、変形したものや膨潤したものは見られなかった（data not shown）。これは宿主マクロファージの何らかの機構によって、Kuroki が排除されていく過程であると考えられた。他の細胞内寄生菌では auto-phagosomal vacuole に包

まれ、殺菌、除去されるものがある。今回観察された膨潤した形態の Kuroki では、そのような膜構造に包まれているものはなかった。

以上の結果から、Kuroki は Karp と同様にファゴサイトーシスで取り込まれ、ファゴソームを脱出するが、Karp がマクロファージの細胞質内で増殖するのに対して、Kuroki は増殖できず、何らかの機構によって排除されていくことが示された。そして、この差異が Karp と Kuroki のマウスに対する毒力の違いに大きく関わっていることが示唆された。

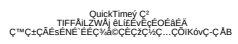


図 1-4　*In vivo* または *in vitro* マウス腹腔内細胞中の Ot の電子顕微鏡像

A: 感染 4 日後の *in vivo* マウス腹腔内マクロファージ中の Karp、B: 感染 4 日後の *in vivo* マウス腹腔内好中球中の Karp、C: 感染 2 日後の *in vivo* マウス腹腔内マクロファージ中の Kuroki、D: 感染 2 日後の *in vitro* マウス腹腔滲出マクロファージ中の Kuroki、E: 感染 4 日後の *in vitro* マウス腹腔滲出マクロファージ中の Kuroki

1-3　考察

Ot の株の中には、これをマウスの腹腔内に接種したとき、マウスを死亡させる強毒株とマウスが生残する弱毒株とが存在する（40）。そこで、強毒株して Karp を、弱毒株として Kuroki を用いて、株間でのマウスに対する毒力の違いを *in vivo*

および *in vitro* の細胞レベルで比較した。

強毒株である Karp を BALB/c マウスの腹腔に接種したとき、マクロファージ、好中球とリンパ球が腹腔内に浸潤し、マクロファージ、好中球内で Karp は対数的に増殖してマウスを殺すことが判った。一方、弱毒株である Kuroki をマウスに感染させた場合は、マクロファージ、好中球、リンパ球が集積したが、それらの数は Karp 感染の場合より少なく、感染 2 週間後には正常数まで減少した。Kuroki の侵入が見られたのはマクロファージのみで、侵入した数は Karp とほぼ同程度だったが、Kuroki の増殖速度は Karp と比べて非常に遅かった。そして、感染 4 日目以降には増殖が抑制された。Kuroki は最終的にマクロファージから除去された。この結果から、腹腔内に浸潤するマクロファージ、好中球、リンパ球数の違い、およびマクロファージ内での増殖の違いが Karp と Kuroki のマウスに対する毒力の差異であることが示唆された。

Ot に感染したマウスの腹腔細胞、またはマウスのマクロファージ細胞株である J774A.1 は数種類のケモカインを分泌することが知られており(62, 63)、その中の幾つかはマクロファージ、好中球、リンパ球を遊走させる（64)。筆者等は好中球とリンパ球に関して充分に解析はしなかったが、Kuroki 感染に対する防御機構にこれらの細胞も関与していると思われる。例えば、モルモットの好中球に Ot を感染させたとき、50%の Ot がファゴソームからその細胞質中に脱出するものの、残りはファゴリソゾームによって消化される（59)。また、リンパ球が産生する IFN-γによってマウスのマクロファージ中の Ot の増殖が抑制される（65）との報告がある。これらのことから、好中球とリンパ球が Ot に対する感染防御に関与していることは明らかである。しかし、*in vitro* のマクロファージでも Kuroki の菌数が減少することから、好中球やリンパ球の関与は必須ではないと考えられる。そして、このマクロファージによる防御機構が Kuroki に対して効果的で Karp には有効でないことは、注目すべき点である。

前述した通り、Ot をマウスに接種したとき強毒性を示す株と弱毒性を示す株に大別される。しかし、低い感染価の Gilliam を接種した場合、C3H マウスは死亡し、BALB/c マウスは生残することが知られている（48)。Gilliam への感受性に関与するマウスの遺伝子は同定されており、early T-lymphocyte activation 1 というサイトカインの遺伝子（49、50、51）の上にマップされている。このサイトカインはマクロファージの遊走と殺菌活性に影響を及ぼす（51、52)。Nacy と Groves (48)は、C3H と BALB/c マウスを用い、これらに Gilliam を腹腔内接種

した結果、C3H の腹腔マクロファージ内では菌が増殖し、BALB/c のマクロファージでは増殖しないことを証明した。しかし、両系統のマウス腹腔から常在マクロファージを調製し、*in vitro* での感染実験を試みると、どちらの系統の細胞でも Gilliam は侵入し、増殖した。これらの観察は、Gilliam の感染に対して BALB/c のマクロファージが耐性であるのは、マクロファージ自身が持っている特質ではなく、*in vivo* の条件でのみ発動する何らかの外的要素の影響によることを示唆している。一方、筆者が Kuroki と BALB/c マウスで行った実験では、Kuroki は *in vitvo* と同様に *in vitro* のマクロファージでも増殖せず、Kuroki の増殖は、他の免疫細胞などの影響を受けず、マクロファージ単独で抑制されていることを示した。即ち、マクロファージ中での Ot の増殖を制御する機構が少なくとも 2 つ存在することが示唆された。一つは、Nacy と Groves（48）が示したマウスの系統に依存する細胞外の要因に影響を受ける機構。もう一つは筆者が発見した、Ot の株に依存する、マクロファージ単独で発動する防御経路である。これが、*in vivo* のマクロファージ中で Kuroki が増殖できない理由であり、Kuroki がマウスに対して弱毒である理由になっていると考えられる。

哺乳類の細胞内への Ot の侵入過程は、マウス脾臓細胞（58）、モルモット好中球（59）と L929 細胞（24）で観察されている。これらの全ての細胞で Ot はファゴサイトーシスによってファゴソーム中に取り込まれ、ファゴソーム膜を融解して細胞質中に脱出することが明らかにされている。しかし、ファゴソーム中の Ot の一部は、細胞質中に脱出できず、ファゴリソゾームによって消化される。本章で、筆者はマウス腹腔のマクロファージでも同じ侵入、殺菌過程が起こっていることを確認した。この過程に Ot 株による差があるか否かを光学および電子顕微鏡で観察したところ、*in vivo*、*in vitro* のどちらでもマクロファージへ侵入する Karp と Kuroki の総数に大きな違いが見られなかった。この結果は、Karp と Kuroki の毒力がファゴサイトーシスによる細胞内への取り込みの効率に依存しないことを示唆する。

更にマクロファージ中のこれら 2 株の侵入過程をファゴリソゾーム内で殺菌される菌数に差があるか否かに注目し、電子顕微鏡で観察した。その結果、両株のファゴソーム中での、正常な形態の菌数と原形質分離を起こしている菌数に有意な違いが見られなかった。これは、感染初期のファゴリソゾームによる殺菌が両株の毒力の違いを分ける要因ではないことを強く示唆している。

Karp と Kuroki の明瞭な差は、感染が進んだ段階で明瞭に観察された。両株は

マクロファージの細胞質中に侵入するが、Kuroki は感染 4 日間で非常にゆっくりとしか分裂せず、その後の増殖はなく、マクロファージ数が腹腔内で減少する頃には排除されるように見えた。一方、Karp は侵入直後からマウスが死ぬまで、対数的に増える。Kuroki はマクロファージ細胞質中に侵入後、形態的に変形し、顕著に膨潤するとともに感染 3 日目には電子顕微鏡では観察できなくなった。しかし、Karp は全期間を通じて形態的に健全なままであった。この観察は、マクロファージによる細胞質内での排除機能を示しているものと思われる。この著者が新たに発見した除去機構はファゴリソゾームによる早期の除去とは明らかに異なり、日数をかけて細胞質から Kuroki を排除するものであった。マクロファージ内で形態が健全なまま増殖するか、変形して膨潤するかの違いが Ot 株間の毒力の重要な決定要素であることが考えられる。

In vitro で培養したマクロファージ内での Kuroki の菌数を光学顕微鏡で観察したところ、感染 8 日目まで大きな変化がなかった（図 1-2）。しかし、電子顕微鏡では感染数日で Kuroki を認めることができなくなるという矛盾が生じた。この理由として考えられるのは、電子顕微鏡では形態だけから Ot を検出せざるを得ないため、感染 3 日目以降は検出が困難となったのに対し、光学顕微鏡では形態に加え、染色性が計数の大きな助けになったためと思われる。事実、ギムザ染色で大きく変形した Ot と思われる構造も観察されたが、Ot と断定する例も少なくなかった。

R. conorii は、TNF α と IFN-γ によって刺激された内皮細胞の細胞質から排除過程で、二重の膜から成る auto-phagosomal vacuole に包まれる（66）。また、細胞質中に *Listeria monocytogenes* が侵入しているマクロファージ様細胞に抗生物質を添加すると、菌は auto-phagosomal vacuole に包まれ、除去される（67）。しかし本研究では、auto-phagosomal vacuole に包まれている Kuroki は全く検出できなかった。Ot に感染した L929 細胞をテトラサイクリンで処理したとき今回観察された変形した Kuroki と似た形態の Ot が観察され、それは auto-phagosomal vacuole に包まれていなかった（68）。これらの観察は、宿主細胞細胞質の中の Ot は auto-phagocytosis 以外の機構で除去されることを示している。

本章では、強毒株 Karp と弱毒株の Kuroki の BALB/c マウスに対する毒力の違いを個体レベル、細胞レベルで比較、解析した。感染早期のファゴサイトーシスの効率、ファゴリソゾームによる排除では Karp と Kuroki で差がなく、ファゴソームから脱出した後、Karp は増殖するが、Kuroki は殆ど増殖することはなく

不活化され、排除されていくものと考えられた。また、この増殖阻害、菌体の排除の機構は、*in vitro* で培養した腹腔マクロファージでも見られるため、マクロファージ単独で行い得るものであることも明らかにすることができた。そして、マクロファージ内で増殖するか否かが Karp と Kuroki のマウスに対する毒力の違いを決定する大きな因子であると考えられた。

第二章　マウス滲出マクロファージの *O. tsutsugamushi* 感染に対する防御因子の検索

第一章から、弱毒の Kuroki はマクロファージのファゴソームを脱出し、細胞質中に侵入はするが増殖しない。一方、強毒の Karp はマクロファージの細胞質中で旺盛に増殖する。このようにマクロファージ中での増殖の可否が Ot の毒力を左右する要因の一つになっていることが示唆された。Gilliam の感染に感受性の低い BALB/c マウスに、致死量に至らない Gilliam を接種した後、腹腔内のマクロファージを *in vitro* で培養すると、常在マクロファージと比べ、殆どのマクロファージが活性化されており、この細胞に再度 Gilliam を接種しても、感染率は上昇しない（54)。これは活性化したマクロファージが Ot の感染防御に関与することを示唆している。

感染防御に働く因子として一酸化窒素（NO)、種々のサイトカイン等をマクロファージが産生する。NO は Ot の近縁菌である偏性細胞内寄生性の *Rickettsia conorii*（66)、*Coxiella burnetii*（69)、*Ehrlichia risticii*（70）および通性細胞内寄生性の *Listeria monocytogenes*(71)の細胞内増殖や herpes simplex virus type 1(72)の複製を抑制する。これらの事実はマクロファージでは NO が細胞内寄生体に対する防御因子となっていることを示唆している。BALB/c マウスを殺傷しない量の Gilliam とそれとほぼ同じ ICU の Karp を BALB/c マウスに接種したとき、マウスの腹腔内には、ケモカインやサイトカインが分泌されることが最近になって報告された。しかし、Gilliam の感染に比べ、Karp を感染させたマウスの腹腔にはより多くのケモカイン類の分泌が見られ、この分泌が過剰であるため、マウスが死ぬことが示唆された（56)。また、マクロファージ様株化細胞に Ot が感染したときに、マクロファージはケモカイン遺伝子を発現する（64）ことも報告されている。一般にマクロファージが分泌する TNFα、IL-1α は、他のマクロファージを活性化する (73, 74)。TNFα と IL-12 は NK 細胞に働きかけ IFN-γを産生させ、*Mycobacterium tuberculosis*、*Leishmania major*、*L. monocytogenes* などの増殖を阻害している（75, 76, 77)。IL-1 は、IFN-γと共に働き、マクロファージ内の *Chlamydia* の増殖を抑制する（78)。このように細胞内寄生体が宿主細胞に侵入し増殖できるか否かは、寄生体そのものの性格だけでなく、宿主側の感染防御応答に大きく依存している。Ot には毒素などの明確な毒力因子は見出されておらず、Ot が感染した場合も、宿主の応答によって Ot が感染した宿主内での増殖の良否に大きく関係していると推察される。

そこで、Ot の強毒株と弱毒株がマクロファージに感染したとき、増殖に差異が起こる原因を追究するため、複数の弱毒、強毒の Ot をマウス腹腔内から調製

したマクロファージに感染させ、マクロファージが産生する NO や主要なサイトカインである TNF、IL-1α を測定した。続いて、これらの防御因子に対する中和抗体、および合成阻害剤を用いると共に、recombinant 蛋白も用いて、これらの因子のいずれが Ot 感染防御に重要であるかを検索した。

2-1　材料と方法

宿主細胞

マウス腹腔滲出マクロファージは前章の方法に従って調製し、Lab-Tek 4 chamber slideの各well内で 5% CO_2存在下、37℃で培養した。

マウス腹腔滲出マクロファージへの*in vitro*での感染実験

Chamber slide上に調製した滲出マクロファージに前章と同様にOt接種液を0.25ml接種し、Otを 2 時間吸着させた。吸着終了後、細胞表面を培養液で洗い、新しい培養液を 0.5ml添加して 5%CO_2存在下、37℃で培養した。任意の時間に培養液を除き、PBSで洗浄後、メタノールで 10 分間固定した。次にギムザ染色を行い、その後細胞を観察した。菌体の計数は第一章の方法に従って行った。

一酸化窒素測定法

Otが感染した滲出マクロファージと非感染細胞は 0.5mM N^G-monomethyl-L-arginine (NMMA)添加または非添加の培地中で培養した。任意の時間後、培養上清を回収し、8000×gで 5 分間遠心して、その上清をNOの分析まで-80℃で保存した。NOの測定はGriess Reagent Kit（同仁化学研究所、東京）を用い、付属の取扱説明書に沿って行った。

マクロファージ培養液中のTNFαとIL-1αの中和血清による中和、および recombinant TNFαとrecombinant IL-1αの添加実験

培養液中の TNFα と IL-1α の中和は、上記感染実験の吸着終了後、新しい培養液に抗マウス TNFα あるいは IL-1α ウサギ血清を添加することにより行った。抗 TNFα および抗 IL-1α 血清の量は、Kuroki の感染（図 2-2B および C）で認められた最大量の 2.5 倍相当を中和する量を添加した。対照には正常ウサギ血清を用いた。

Recombinant マウス TNFα あるいは IL-1α の添加は、中和血清添加の場合と同様に、吸着終了後、培養液に添加した。Recombinant マウス TNFα および IL-1α は、Kuroki 感染（図 2-2B および C）で認められた最大量の 2.5 倍に相当する量を添加した。

TNF、IL-1α測定法

Ot感染マクロファージの培養上清中のTNFの測定は、L929細胞を用いた細胞傷害測定系によった。まず、二倍段階希釈した培養上清100μlを4μg/mlアクチノマイシンD含有10%FBS加MEM100μlと混合し、96穴のマイクロプレートに単層培養したL929細胞上に添加した。これを18〜24時間5%CO2存在下37℃で培養した後、培養液を除去し、3.7%ホルムアルデヒド、0.1M酢酸ナトリウム、9%酢酸溶液で固定した。その後、残存細胞を0.05%アミドブラックで染色し、温水で3回洗浄した。100μlの0.025N NaOHで色素を抽出し、溶け出した色素を630 nmで検出した。この吸光度から残存細胞率を求め、試料の希釈率を横軸に残存細胞率を縦軸にプロットし、50%残存細胞率からTNF量を算出した。尚、この測定法は細胞傷害を見ているため、TNFαとβを同時に測定することになる。マクロファージが産生するのはTNFαであるが、ここで得られた値はTNFとして表記する。

IL-1αの測定にはenzyme-linked immunosorbent assay kit (Genzyme Co., Cambridge, Mass.)を用い、付属の取扱説明書に沿って行った。

O. tsutsugamushi

Otのマクロファージ感染におけるNOの解析にはKarpとKurokiを用いた。TNF、IL-1αの解析には強毒株としてKarpに加えてGilliamを、弱毒株としてKurokiに加えてKawasakiを用いた。Karp、Gilliam、Kuroki、Kawasakiの培養は第一章の方法に従いL929細胞中で培養した。

2-2　結果

2-2-1　Ot感染マクロファージの一酸化窒素産生（NO）とその殺菌効果

第一章の結果から、強毒のKarpはマクロファージ中で増殖し、弱毒のKurokiは増殖しないことが判った。これらの増殖の差異にマクロファージの産生するNOが関与するかどうかを調べた。

Karpが感染した細胞では、NOは経日的に増加するものの非感染細胞と同レベルであった。一方、Kurokiが感染した場合のNOは、非感染細胞やKarpが感染した場合のレベルと比較して顕著な増加を示した（図 2-1A）。この結果から、Karpの感染は新たなNOの誘導を引き起こさないが、Kurokiはマクロフ

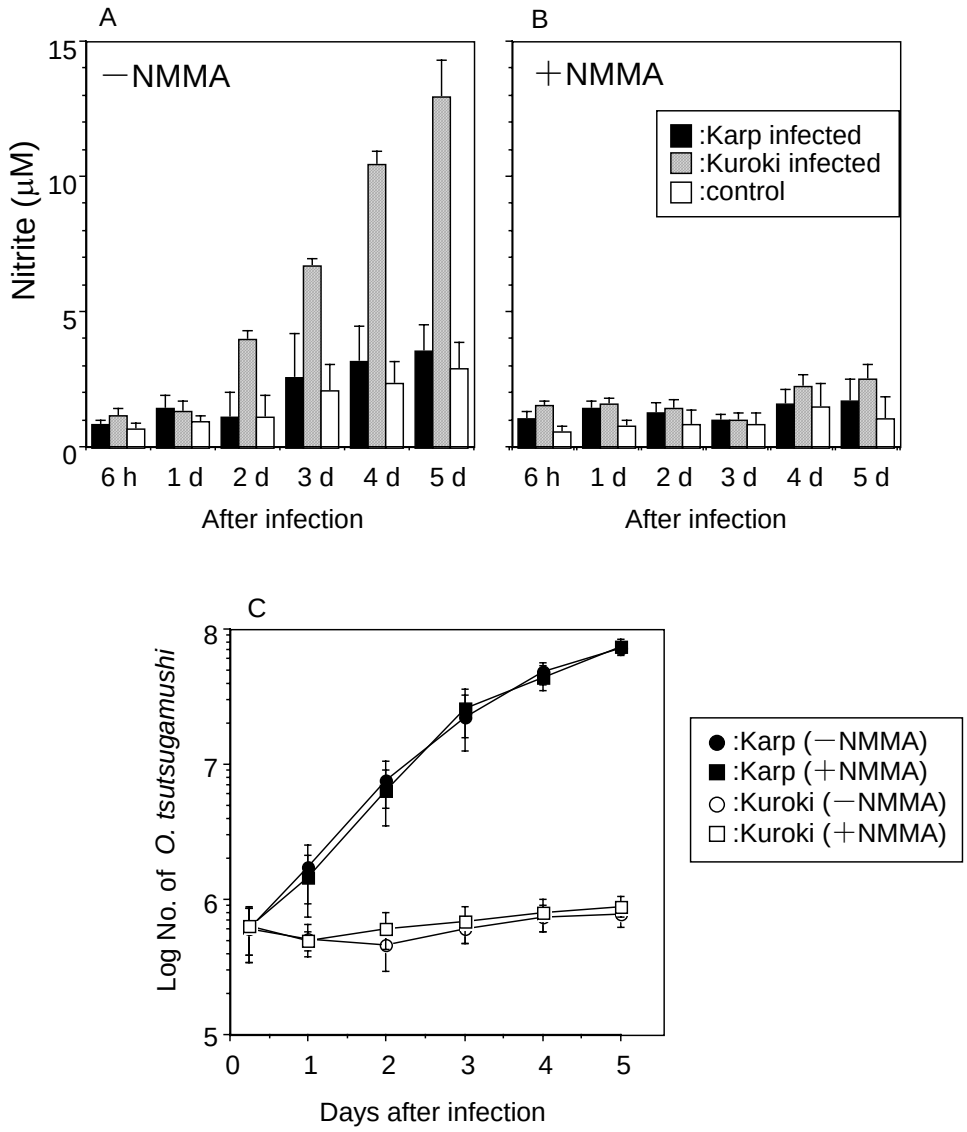


図 2-1　N^G-monomethyl-L-arginine（NMMA）処理および未処理したOt感染マウス滲出マクロファージ中のKarpおよびKurokiの増殖と感染細胞のNO量

A: NMMA 未処理場合の培養上清中の NO 量、B: NMMA 未処理場合の培養上清中の NO 量、■：Karp、▨：Kuroki、□：非感染細胞、C: Karp（黒）、Kuroki（白）、四角：NMMA 添加、丸：NMMA 非添加。

ァージの NO の産生を促進することが明らかとなった。

そこで、NOがマクロファージ内のKurokiの増殖に影響しているのかを確認するため、NO合成阻害剤であるN^G-monomethyl-L-arginine（NMMA）を培地に添加し、同様の実験を試みた。その結果、すべての系でNO量は減少し、

表2-1　0t接種液の感染価とマウスに対する毒力

Strain	Inocula (ICU*/0.25ml)	LD_{50}**/0.25ml***	LD_{50}/ICU
Gilliam	1.93×10^{6}	1.78×10^{1}	9.22×10^{-6}
Karp	2.25×10^{6}	5.62×10^{3}	2.20×10^{-3}
Kawasaki	8.26×10^{6}	$< 3.16 \times 10^{0}$	$< 3.83 \times 10^{-7}$
Kuroki	1.49×10^{6}	$< 3.16 \times 10^{0}$	$< 2.12 \times 10^{-6}$

*: 10% infectious dose in L929 cell culture.

**: 50% lethal dose in BALB/c mice.

***: L cells in a chanber and mice were received 0.25ml of inocula.

Kuroki が感染した細胞の NO 産生は非感染細胞、Karp が感染した細胞の NO レベル、またはそれ以下にまで減少した（図 2-1B）。しかし、マクロファージの NO 産生が非感染細胞の程度になっても、Kuroki の増殖には影響しなかった（図 2-1C）。即ち、感染マクロファージが合成する NO は強毒株と弱毒株とで大きく異なるが、株間の増殖の差に関与する因子ではないと考えられる。

2-2-2　Ot の強毒、弱毒 4 株のマクロファージ内での増殖

マウスに対する毒力とマクロファージ中の増殖の可否の相関性をより多くの Ot 株を用いて検証するため、表 2-1 に示すように、強毒株の Gilliam、弱毒株の Kawasaki を追加した合計 4 株について、マクロファージ中の増殖を比較した。Gilliam は Karp と同様に滲出マクロファージ中で対数的に増殖し、Kawasaki は Kuroki と同様に細胞質中に侵入するものの、増殖せず、4 株の毒力とマクロファージ内での増殖との間には前章で認めた相関性が確かめられた（図 2-2A）。

2-2-3　強毒と弱毒 4 株感染マクロファージの TNF、IL-1α、NO 産生

4 株を感染させたマクロファージの培養上清中に分泌される TNF、IL-1α、NO の量を測定した（図 2-2B～D）。強毒の Karp もしくは Gilliam に感染したマクロファージの培養上清中に産生される TNF 量は、実験期間を通じて対照と同じく、検出限界以下であった。しかし弱毒の Kuroki と Kawasaki に感染したマクロファージの場合は、感染 4～8 時間後に一過性に TNF が培養上清中に認められ、その後検出できなくなった（図 2-2B）。培養上清中の IL-1α は実験

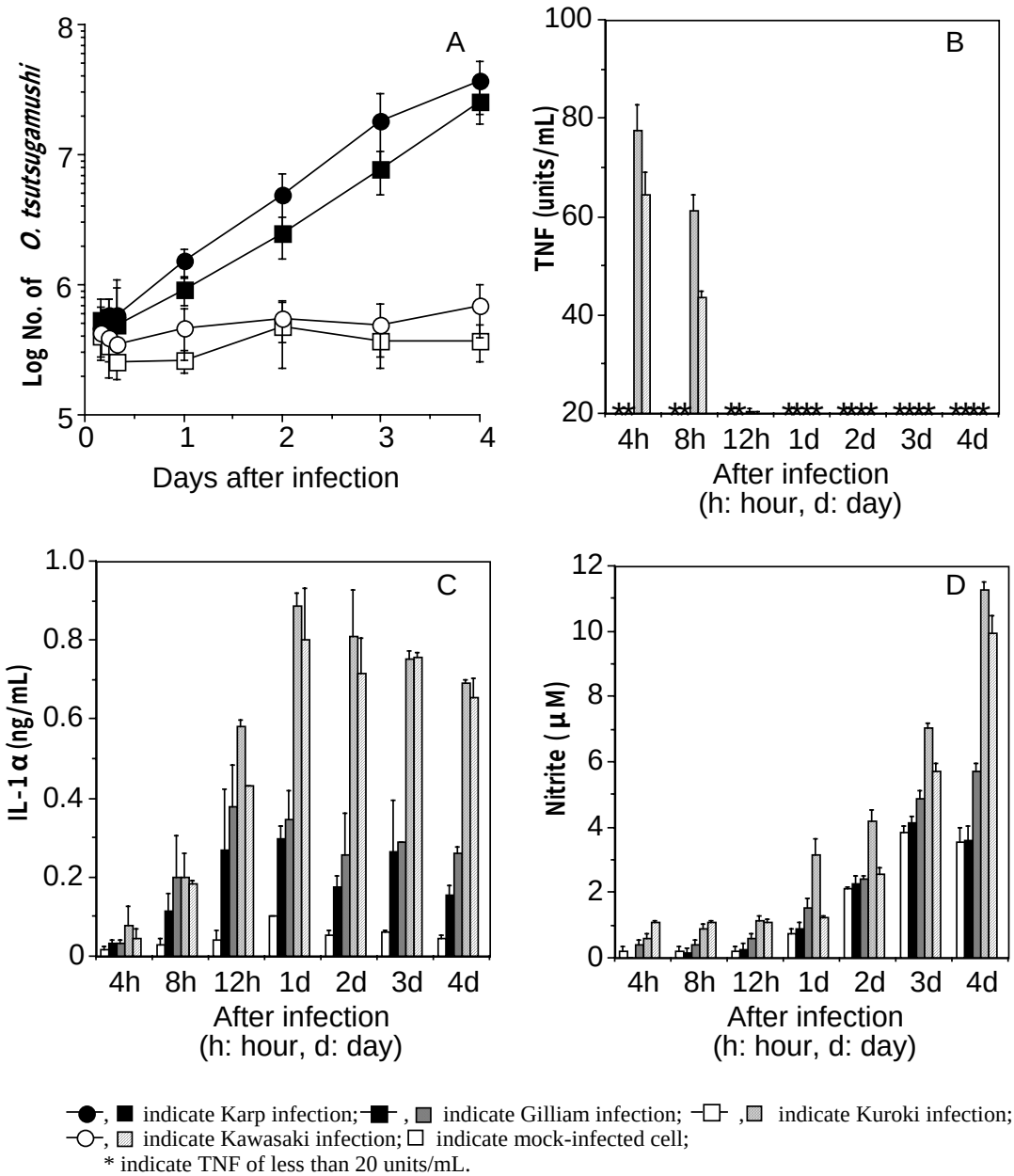

A
B
C
D
Log No. of O. tsutsugamushi
Days after infection
TNF (units/mL)
After infection
(h: hour, d: day)
IL-1α (ng/mL)
Nitrite (μM)
4h 8h 12h 1d 2d 3d 4d
, ■ indicate Karp infection; , ■ indicate Gilliam infection; , indicate Kuroki infection;
, indicate Kawasaki infection; □ indicate mock-infected cell;
* indicate TNF of less than 20 units/mL.

図 2-2　*In vitro* マウス腹腔滲出マクロファージ中の Ot の増殖とその感染細胞の TNF、IL-1α、NO の産生

A: マクロファージ中の Karp、Gilliam、Kuroki、Kawasaki の増殖、Ot 各株感染および非感染マクロファージの TNF 産生（B)、IL-1α産生（C)、NO 産生（D）

を行った全ての株で感染 4 時間後から対照より高い濃度が認められ、1 日目にピークとなりその後ゆっくり減少した。その量は、弱毒の 2 株に感染したマクロファージの方が強毒株に感染した細胞より常に高かった（図 2-2C)。培養上清中の NO 量は、非感染細胞の場合を含め、感染 1 日後から 4 日後まで増加し続けた。Karp もしくは Gilliam に感染したマクロファージからの NO 量は、非感染細胞とほぼ同じであったが、Kuroki 感染の場合は感染 1 日目から、Kawasaki 感染の場合には感染 4 日目に、NO は他の 2 株の感染細胞の分泌量と比較して約 2 倍に増加した（図 2-2D)。

以上の TNF、IL-1α、NO についての観察事実は、強毒の Gilliam と Karp で差が殆どなく、弱毒の Kuroki と Kawasaki とでも差がなかった。しかし、この 2 つのグループ間での差は明瞭であった。従って、このグループ間の違いは Ot 株のマウスに対する毒力を反映していると考えられた。

2-2-4　培養上清中の TNFα の中和

Ot の感染における TNF の役割を調べるため、培養上清中の TNF を中和することを試みた。抗マウス TNFα ウサギ血清を培養液に添加した後、4 株のマクロファージ中の増殖を観察し、培養上清中の IL-1α、NO の量を測定した。対照には正常ウサギ血清を培地に加えた。

強毒の Karp と Gilliam の増殖は、抗血清の存在によって全く影響を受けなかったが（図 2-3A、C)、弱毒の Kuroki と Kawasaki の増殖は改善され、殆ど増殖しなかったものが、培養 4 日目で約 6〜7 倍に増殖した（図 2-3B、D)。

これは、弱毒株の感染によって、マクロファージが分泌した TNF が、マクロファージ自身に働き、弱毒株の増殖を抑制していたことを示している。

従って、TNF 産生が誘導されるが否かが Ot の弱毒株と強毒株がマクロファージ内で増殖するか否かを決定する因子の一つであることが考えられた。しかし、抗 TNF 抗体によって、弱毒株の増殖が改善されても、強毒株の増殖速度には及ばず、TNF 以外にも増殖抑制因子があることが示唆された。

抗 TNF 血清添加による培養上清中の IL-1α の変化は、Karp もしくは Gilliam に感染したマクロファージでは非感染細胞（図 2-4E）よりは多いものの、非添加群と変わらなかった（図 2-4A、B)。Kuroki もしくは Kawasaki の感染では、IL-1α 量は非添加群の 55〜85%に抑制された（図 2-4C、D)。また、抗血清添加時の NO の変化を図 2-5 に示す。Karp もしくは Gilliam に感染した細胞の場

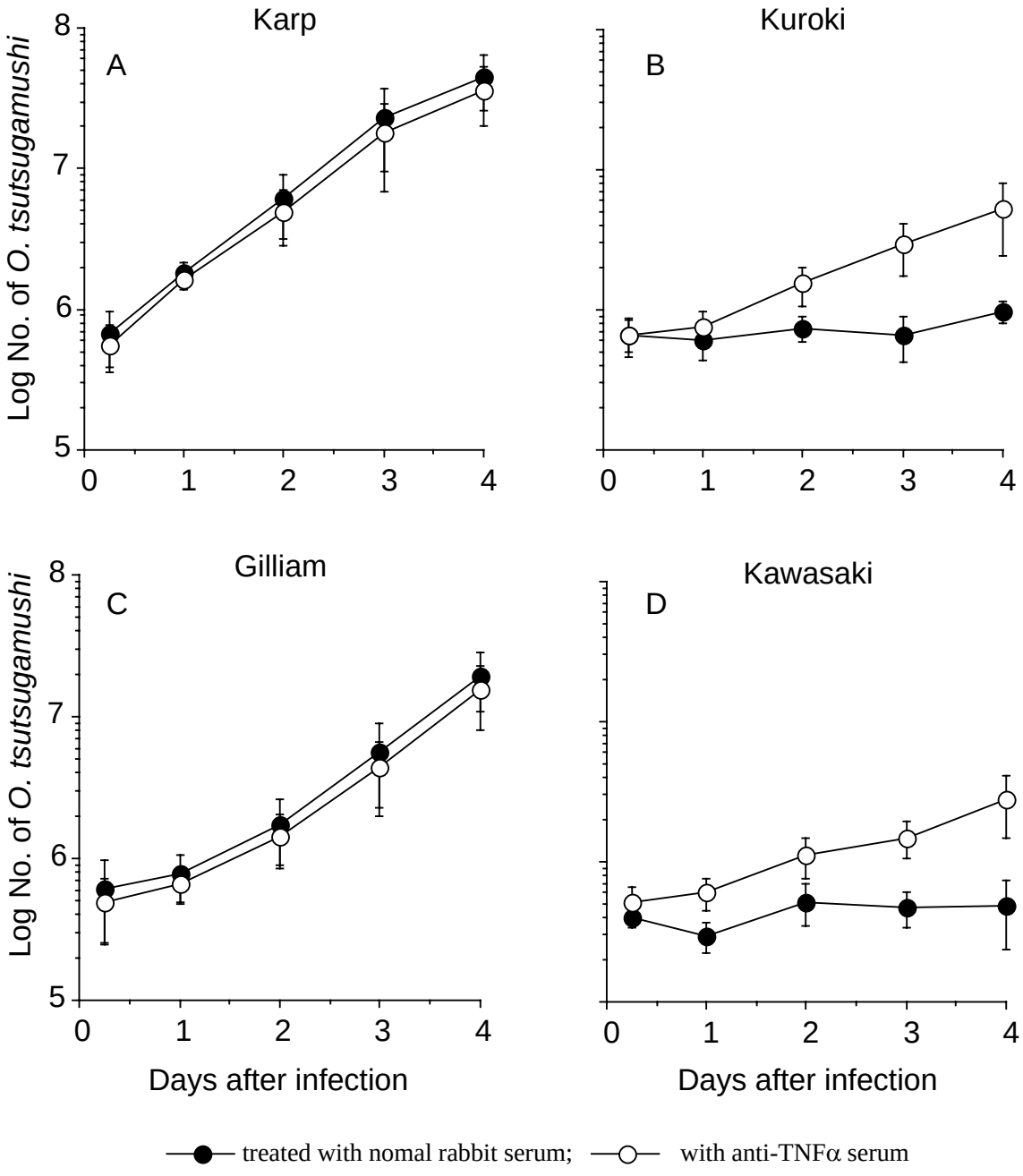


図 2-3　抗 TNFα中和血清添加および非添加の場合の Ot 各株の増殖

A：Karp、B：Kuroki、C：Gilliam、D：Kawasaki

合、抗体添加による NO の変化は少ないが（図 2-5A、B)、これに対し、Kuroki もしくは Kawasaki の感染では、大量に生成されていた NO 量が顕著に減少した（図 2-5C、D)。抗血清は、この実験では 2 時間の Ot 吸着時には培地に加えて

いなかった。しかし、吸着時に加えたときも、同様の結果であった。

この結果は、強毒株に感染したマクロファージでは、TNF は産生しないので、TNF を中和しても IL-1α、NO の産生に変化がないが、弱毒株の感染細胞は、TNF を産生するので、これを中和すると IL-1α、NO が減少すると考えられる。従って、TNF が IL-1α と NO 生産の誘導に影響を与えていることを示唆している。

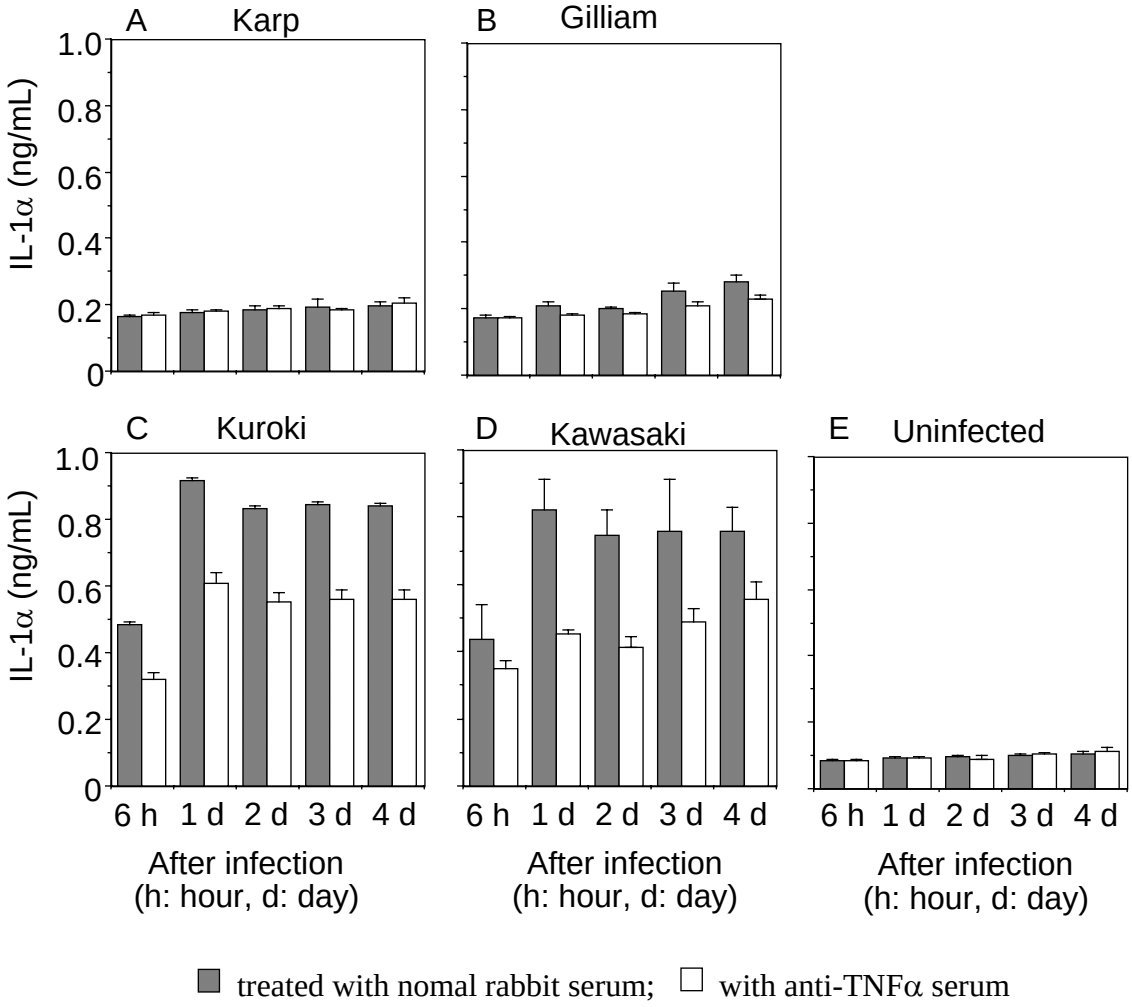


図 2-4　抗 TNFα中和血清添加および非添加の場合の Ot 各株感染細胞の IL-1α産生の経時変化
A：Karp、B：Gilliam、C：Kuroki、D：Kawasaki、E：非感染細胞

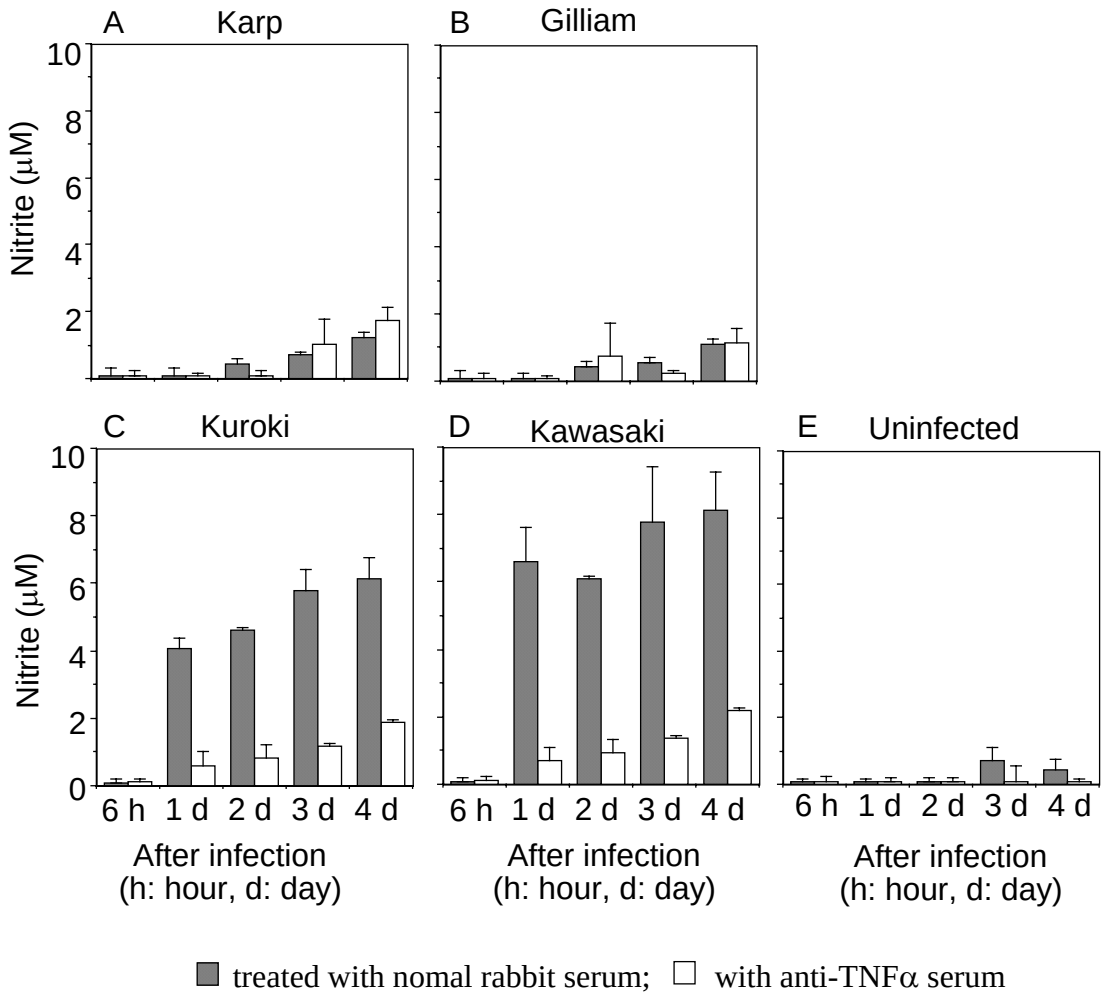


図 2-5　抗 TNF α中和血清添加および非添加の場合の Ot 各株感染細胞の NO の産生の経時変化
A：Karp、B：Gilliam、C：Kuroki、D：Kawasaki、E：非感染細胞

2-2-5　培養液への TNF α の添加

強毒株に感染してもマクロファージは TNF を産生しないため、予想された通り、上記の実験で抗 TNF 抗体を添加しても、その増殖に影響しなかった。そこで、TNF α の効果を更に解析するために、recombinant マウス TNF α を培養液中に添加し、マクロファージ中の 4 株の増殖と、培養上清中に認められる TNF、IL-1 α、NO の量を調べた。

Recombinant TNF α は、Kuroki 感染（図 2-2B）で認められた最大量の 2.5 倍に

相当する 200 unit/ml を添加した。TNF α を添加することによって、Gilliam の増殖は止まり、Karp の増殖は緩慢となった（図 2-6A-1、2)。そして、殆ど停止した増殖は、感染 2 日以降に回復し、増殖速度は非添加群と同じになった。このとき、培地中に認められる TNF 量は、Karp に感染した場合は感染 6 時間、Gilliam の場合は感染 1 日目までは recombinant TNF を加えた非感染細胞より多く、感染 2 日目以降は殆ど検出限界レベルまで低下した（図 2-6B-1～3)。この結果から、TNF が培地中に存在する間、Karp と Gilliam の増殖は抑制され、培地から TNF が消えると増殖が再開されたと考えられる。これらの結果から、Karp と Gilliam も TNF に感受性があり、TNF 存在下では増殖が抑制されることが明らかとなった。このことは、強毒株も TNF に感受性があるものの、TNF 産生を誘導しないため、マクロファージ内で増殖できることを示唆している。

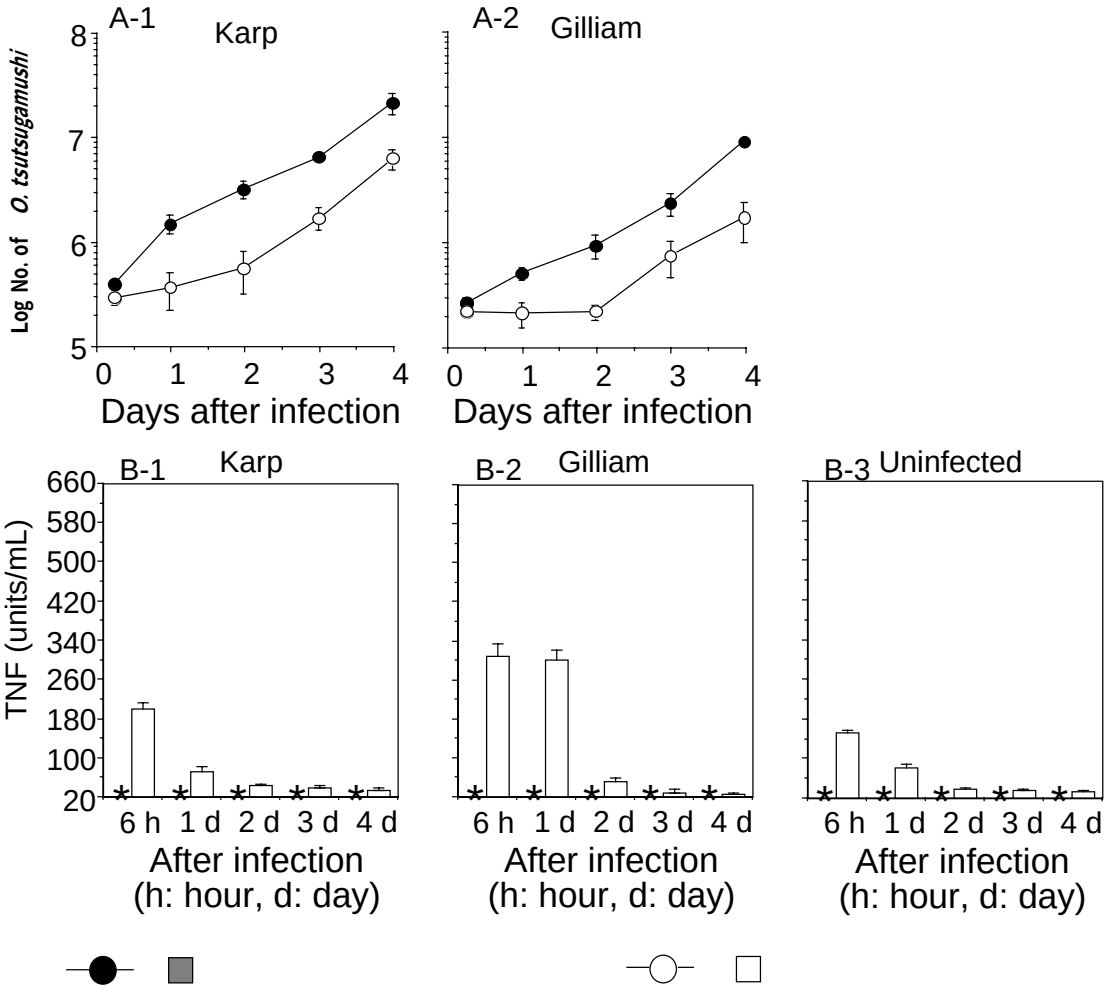
一方マクロファージ中では増殖が見られない弱毒株では、Recombinant TNF α の添加による変化は殆どなく、Kawasaki の菌数が僅かに減少する傾向が見られた（図 2-7A-1、2)。培地中の TNF 量は、感染 6 時間後で非添加群の場合より約 3 倍高く、その後は減少するものの、感染 3 日目まで非感染の場合より多かった（図 2-7B-1～3)。この結果から、感染初期にマクロファージから分泌される TNF 量で弱毒株の増殖は十分に抑制されると考えられる。

TNF α 添加による Ot 感染細胞の IL-1 α と NO の変化を図 2-8 および 2-9 に示す。Karp もしくは Gilliam に感染した場合、どの時間でも TNF α 添加によって非添加群より IL-1 α、NO とも僅かに増加したのみであった（図 2-8A、B、E、2-9A、B、E)。一方、弱毒株に感染した細胞の場合、IL-1 α は約 1.5～3 倍に（図 2-8C、D)、NO は約 2 倍になり（図 2-9C、D)、非添加群と比べて顕著な増加が見られた。TNF の添加によって、強毒株および弱毒株に感染した細胞が産生する IL-1 α および NO 量は、非添加の場合に比べて多く、TNF は IL-1 α と NO の産生に影響することが示唆された。

2-2-6　培養上清中の IL-1 α の中和と培地への IL-1 α の添加

TNF の中和によっても、弱毒株の増殖は強毒株に及ばない。このとき、IL-1 α の産生は完全には抑制されない。そこで、Ot の増殖に対する IL-1 α の影響を知る目的で、抗 IL-1 α 中和抗体、および recombinant IL-1 α を感染細胞に添加した。加えた量は、Kuroki 感染（図 2-2C）で認められた最大量である 0.8ng/ml の 2.5 倍量を中和する抗体、もしくは 2ng/ml の recombinant IL-1 α とした。その

結果、いずれの株の Ot に対しても、中和抗体による増殖の改善も recombinant IL-1α による増殖の抑制も見られず（図 2-10)、IL-1α は Ot のマクロファージ中の増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。



, treated with nomal rabbit serum; , with recombinant TNF α

* indicate TNF of less than 20 units/mL. recombinant mouse TNF α 添加の場合

図 2-6 非添加の場合の腹腔滲出マクロファージ中の Ot 各株の増殖および培養上清中の TNF の推移

A：マクロファージ中の Ot の増殖、B：TNF の推移；1：Karp、2：Gilliam、3：非感染細胞

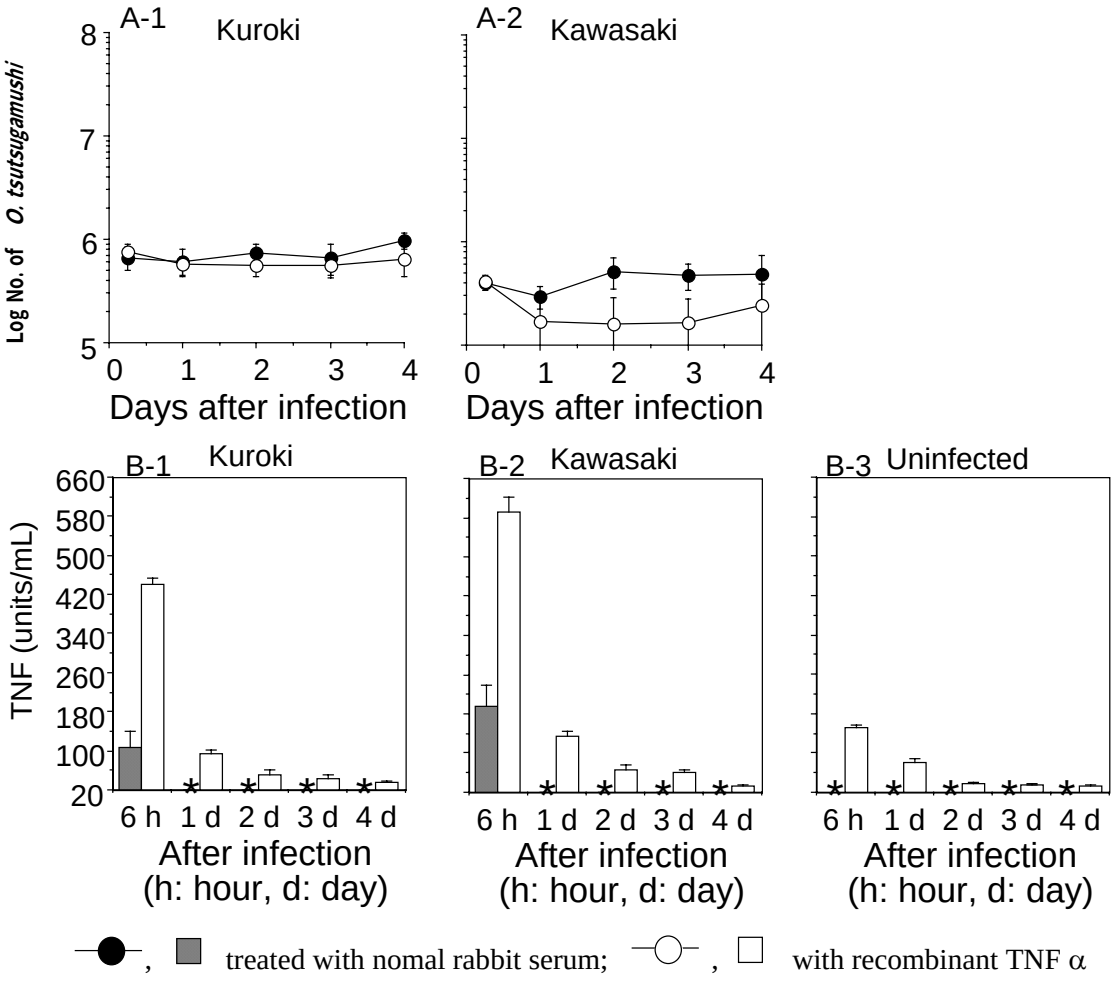


図2-7　Recombinant mouse TNFα添加および非添加の場合の腹腔滲出マクロファージ中のOt各株の増殖および培養上清中のTNFの推移

A：マクロファージ中のOtの増殖、B：TNFの推移；1：Kuroki、2：Kawasaki、3：非感染細胞

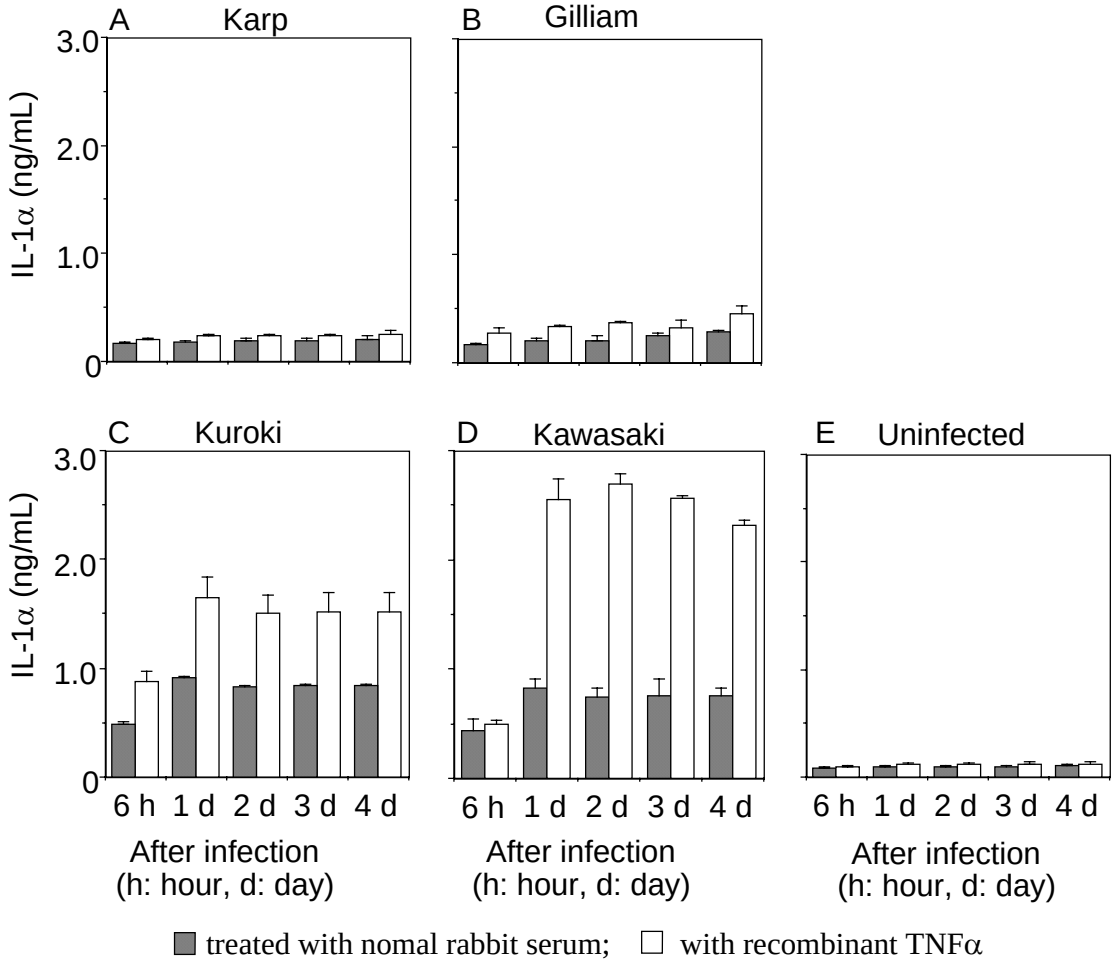


図2-8　Recombinant mouse TNFα添加および非添加の場合のOt各株感染細胞のIL-1αの産生の経時変化

A：Karp、B：Gilliam、C：Kuroki、D：Kawasaki、E：非感染細胞

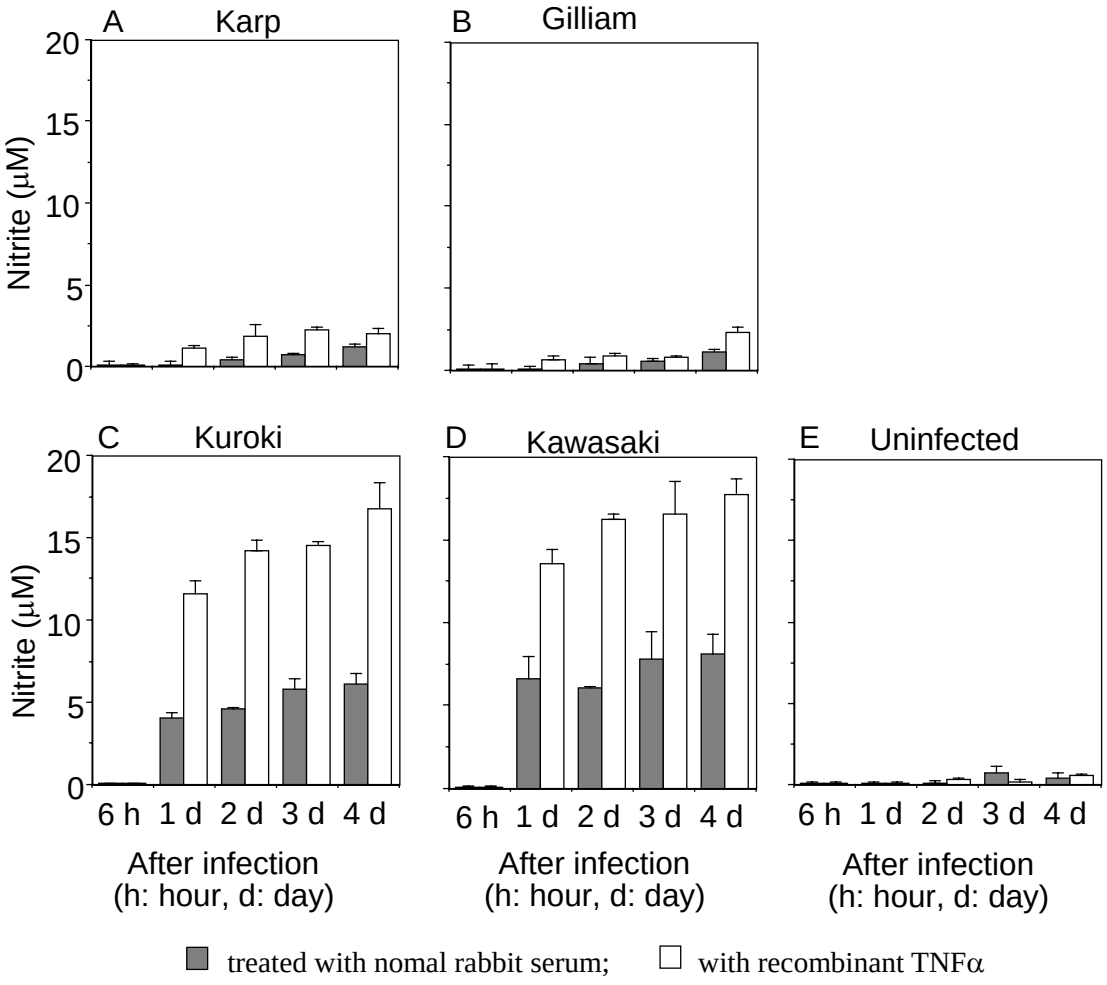


図 2-9　Recombinant mouse TNF α 添加および非添加の場合の Ot 各株感染細胞の NO の産生の経時変化

A：Karp、B：Gilliam、C：Kuroki、D：Kawasaki、E：非感染細胞

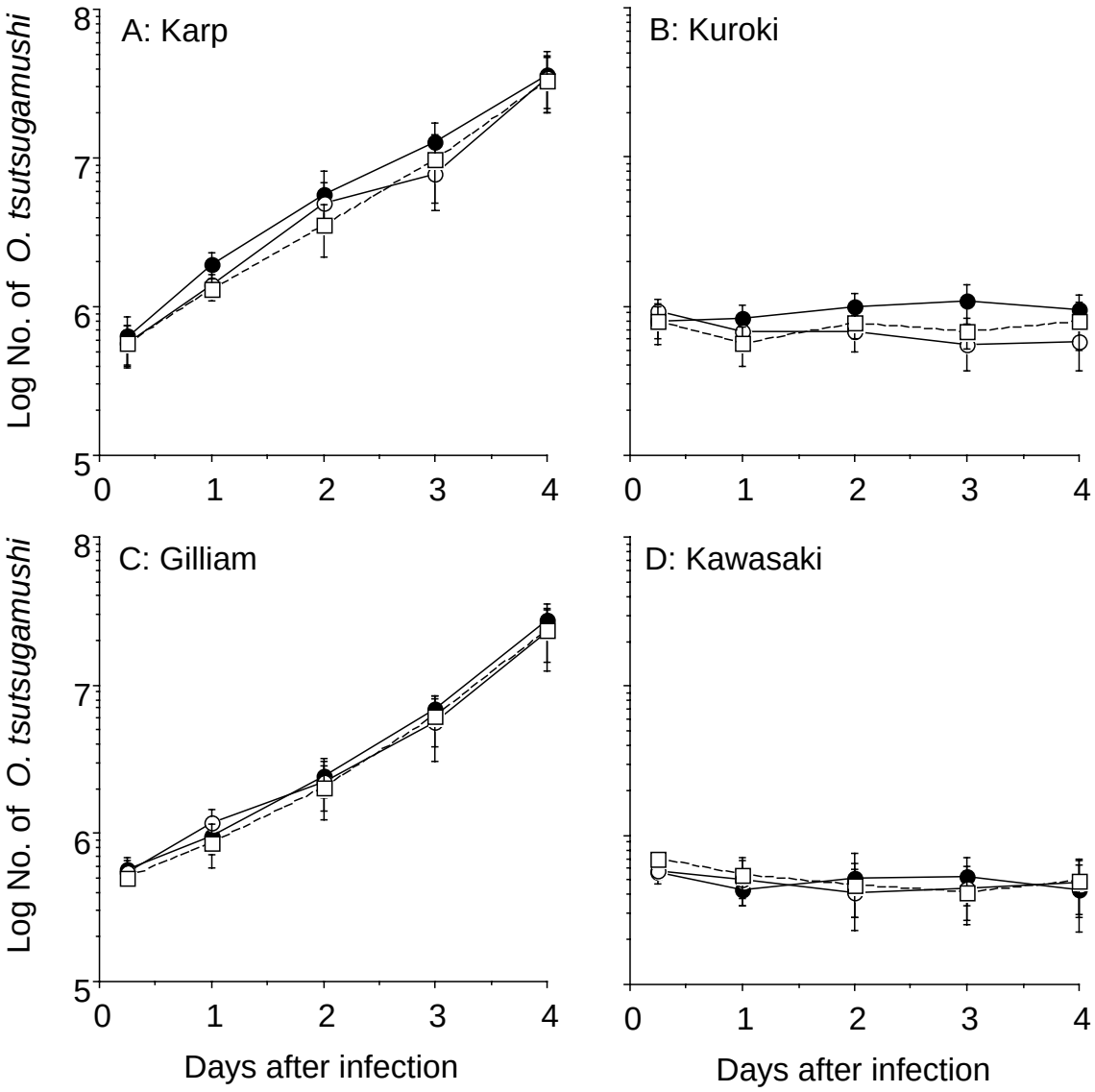


図 2-10　抗 IL-1α中和血清添加および recombinant mouse IL-1α添加後の腹腔滲出マクロファージ中の Ot 各株の増殖

A: Krap、B: Kuroki、C: Gilliam、D: Kawasaki の増殖。●：非添加、○：抗 IL-1α血清添加、□：recombinant IL-1α添加

2-3　考察

第一章で *in vivo*、*in vitro* のマクロファージ中で Kuroki は形態が変化して増殖しないが、Karp は形態の変化もなく、旺盛に増殖することが判明した。細胞内寄生菌感染に対する防御には NO や TNF、IFN-γ（71, 79, 80）などが効果を示すことが知られている。Ot に近縁で偏性細胞内寄生性の *R. conorii*（66）、*C. burnetii*（69）、*E. risticii*（70）は NO により細胞内の増殖が抑制される。これらの結果は NO が細胞内寄生菌に対して増殖を抑制する因子となっていることを示している。そこで、Ot に感染したマクロファージが産生する NO に着目した。*in vitro* のマクロファージに強毒株または弱毒株をそれぞれ 2 株ずつ感染させたとき、強毒の Karp もしくは Gilliam に感染した細胞の培地中に蓄積する NO 量は、非感染細胞の場合と同程度であったが、弱毒の Kuroki もしくは Kawasaki に感染したマクロファージは、多量の NO を培地中に放出することが明らかとなった。マクロファージ内における強毒および弱毒株の増殖の差異と、感染した細胞が産生する NO との関連性を知るため、NO 合成阻害剤である NMMA を用い、NO 量を非感染細胞での量にまで低下させたが、Kuroki の増殖は全く促進されなかった。Karp の増殖もまた、変化がなかった。マウス上皮細胞中の *R. conorii* の増殖が NMMA により回復した（66）結果とは異なり、この結果は、Kuroki に感染した細胞は NO を顕著に合成するが、NO が Kuroki の増殖には殆ど影響を及ぼさないことが強く示唆された。従って、弱毒株の感染では、強毒株の感染より多く NO は合成されるが、これが毒力の違いを規定する因子ではないと考えられる。

IL-1 は、IFN-γ と共に働き、マクロファージ中に *Chlamydia*（78）や group B streptococci（81）の増殖を抑制するために働く酵素の活性を増大させる。IL-1α が Ot の増殖に関与するか否かを知るため、Ot に感染したマクロファージの培養上清中の IL-1α 量を測定した。培養上清中の IL-1α 量は、強毒の Karp や Gilliam に感染したマクロファージより弱毒の Kuroki や Kawasaki の場合の方が高値を示した。即ち、NO 産生の場合と同様に、弱毒株に感染した細胞がより多くの IL-1α を産生することが明らかとなった。しかし、抗 IL-1α の中和抗体による中和での弱毒株の増殖は改善されず、recombinant IL-1α の添加によっても強毒株の増殖は抑制されることはなく、IL-1α は Ot の増殖に影響しないことが示された。従って、弱毒株の感染では、強毒株の感染に比べ、より多く IL-1α が産生されるが、これが Ot のマクロファージ内で増殖の差異に関与しないことが示唆された。

Ot の弱毒株の感染では、TNF は IL-1、NO に先だって分泌されるものの、強毒株の感染では全く検出できなかった。IL-1、NO の強毒株と弱毒株との差が量的なものであったのに比べて、TNF での違いは際だっていた。TNF は細胞内寄生菌に対する防御に重要な役割を果たすことが示唆されており、TNF によりマクロファージ内に superoxide が生成され *Mycobacterium avium* の増殖が抑制される（79）。また、抗 TNF α 抗体は、マクロファージ中の *M. tuberculosis*（75）やマウスの肝臓や脾臓中の *L. monocytogenes*（73）の増殖を促進する。そこで、抗 TNF 抗体と recombinant TNF の感染マクロファージ培養系への添加を試みた。

抗 TNF α 血清を用いて培養液中の TNF α を中和したところ、マクロファージ中の Karp や Gilliam の増殖には変化がなかったが、全く増殖しなかった Kuroki や Kawasaki は分裂を始め、培養 4 日目の菌体数は感染当初の 6〜7 倍にまで増加した。これとは逆に、recombinant TNF の添加は Kuroki、Kawasaki への影響はほとんどなく、Karp と Gilliam の増殖を抑制した。これらの観察から、Ot の増殖を TNF が大きく抑制していることが明らかになった。

抗 TNF α 抗体の添加により、Ot 弱毒株の感染によって産生される IL-1 α および NO は、顕著に抑制された。Recombinant TNF の添加により、強毒株および弱毒株に感染した細胞の IL-1 α および NO の産生量は、程度に差はあるものの、非添加群に比べ増加した。このことから、TNF はマクロファージの産生する IL-1 α と NO に影響を与えるとが明らかになった。

これまでの結果から、抗 TNF 抗体の添加により、弱毒株の増殖が改善され、recombinant TNF の添加によって、強毒株の増殖が抑制されるため、TNF が Ot の増殖に影響していることが明らかとなった。しかし、TNF の中和によって、弱毒株の増殖は強毒株と同等にならないため、TNF だけではない、IL-1 α、NO 以外の因子の関与もあることが示唆された。

Ot 感染時に TNF が分泌されるか否かについては、株化細胞を用いた報告がある。マウスのマクロファージ様株化細胞である P388D1 が Karp に感染しても、TNF α の産生はない（82）が、Boryong は J774.1 細胞に TNF α を分泌させる（83）。この Karp での報告は本論文の観察と一致する。しかし Boryong については、マウスを殺すという報告（84）はあるものの、その正確な毒力は明らかになっていない。Boryong は強毒株でありながら TNF を誘導する可能性もある。しかし、筆者も当初は調製が容易な J774.1 などの株化細胞を用いていたが、細胞の入手先や継代数によって TNF、NO の産生が大きく異なり、再現性のある結果を得ら

れなかった。そこで結果が安定する腹腔滲出マクロファージを用いることにした。得られた結果を普遍にするため、腹腔滲出マクロファージを宿主とし、強毒株、弱毒株を 2 株ずつ用い、TNF、IL-1α、NO について数多くの実験を行った。その結果、強毒株と弱毒株の感染によって、それらの分泌量が大きく異なるが、強毒株どうし、弱毒株どうしの分泌量はほぼ同じであった。従って、この結果は Ot の毒力に関して多くの株に適用されるものと思われる。そして、抗体による中和実験、recombinant 蛋白の添加などの実験によって、感染時にマクロファージから TNF が分泌されるか否かが、細胞質に侵入した Ot が増殖の可否を決定する重要な因子となっていることが示唆された。

第三章　*O. tsutsugamushi* 分離株のマウスに対する毒力と感染 *in vitro* マウス滲出マクロファージの TNF 産生との関係

Ot が *Rickettsia* 属であった頃、発疹チフスや紅斑熱リケッチアと異なる特徴として、抗原性とマウスに対する毒力の差が株ごとに大きいことが挙げられており（85)、抗原性と毒力の相関が話題となっていた。Ot の株間での抗原性の差異は、表層に多量に存在する 56kDa の型特異抗原蛋白の相違によるものであること、他の抗原物質は型特異性にほとんど関与しないこと(25, 43)が明らかにされた。この抗原蛋白には、株毎に一次構造が大きく異なる 4 箇所のドメインが存在していること(86)が明らかになった。それと時を同じくして、モノクローナル抗体が多数調製され、Ot の型別は、型特異抗血清から 56kDa 型特異抗原蛋白に対するモノクローナル抗体を用いる方法(43, 87, 88)に移行していった。また、この蛋白の遺伝子を標的として、その増幅産物の restriction flagment length polymorphism（RFLP）による解析、型特異プライマーを用いた PCR 法(89, 90)、そして遺伝子の塩基配列の比較による遺伝子型別へと移っていった。筆者等が保有する我が国の患者およびツツガムシから得られた分離株のうち、34 株と標準株 6 株をモノクローナル抗体および 56kDa 蛋白の遺伝子配列による型別を行ったところ、原型である Gilliam、Karp 株と日本で分離された Gilliam 型、Karp 型の 56kDa 蛋白遺伝子の RLFP パターンや塩基配列が大きくが異なっていることが明らかとなり、それぞれ JG 型、JP 型と呼ばれるようになった(40, 91, 92)。日本の分離株の型は JG、JP、Kato、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi、およびダニから分離された LX-1、Fuji 型に分けられるようになった。これらの他に、国外で分離された Gilliam、Karp など多数の抗原型がある（93, 94)、日本で分離される全ての型と標準型に含まれる 19 株についてマウスに対する毒力を調べたところ、Gilliam、Karp、JG および Kato 型の株は強毒であり、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi、LX-1、Fuji 型に属する 8 株すべてが弱毒性を示すことが判明した(40, 91, 95)。また、弱毒株の分離法が確立されて以来、分離される株は弱毒性のものが多い。これまでに分離された Kawasaki、Kuroki 型の株は全て弱毒性を示している（96)。他の型では、分離例が少なく、1 型あたり 1〜2 株しか分離できていない。

第二章の結果から、Gilliam、Karp、Kawasaki、Kuroki のマウスに対する毒力の強弱とマクロファージ内での増殖の有無に明瞭な相関が認められた。そして、*in vitro* で TNF を中和した実験から、Ot の弱毒株は、感染したときにマクロファージが分泌するこのサイトカインによって増殖が阻害されることが示唆された。本章では、マクロファージ中での増殖性と TNF 産生誘導の相関性を、第二章で用いた 4 株以外の他の分離株について調べた。そして、この相関が Ot に普遍的

なものであるか否かを検証した。

3-1　材料と方法

宿主細胞

マウス腹腔滲出マクロファージは第一章の方法に従い調製し、Lab-Tek 4 chamber slideの各well内で 5% CO_2存在下、37℃で培養した。

Otの培養

使用したOtの分離株は表3-1に示した。その培養は第一章の方法に従いL929細胞中で培養した。

マウスへの接種およびLD_{50}の算出は、第一章の方法に従って行った。

*In vitro*でのマウスのマクロファージへの感染実験

Chamber slide上に調製したマクロファージにOtを 0.25ml接種し、5%CO_2存在下、37℃で 2 時間培養した。その後、細胞表面を培養液で洗い、新しい培養液を 0.5ml添加して 5%CO2 存在下、37℃で培養した。任意の時間に培養液を回収し、PBSで洗浄後、メタノールで 10 分間固定した。次にギムザ染色を行い、その後細胞を観察した。

TNF測定法

Ot感染マクロファージの培養上清中の TNF の測定は、第二章の方法によった。

3-1　結果

本章では、表 3-1 に示す患者およびダニから分離された代表的なOt株の 11 株を用いた。マウスに対するLD_{50}は、Gilliam、Karp、Kato、Kawasaki、Kurokiに関してはすでにddYマウスとC3H/HeJマウスで、その他の 6 株はddYマウスで算出されている（40,

表3-1　使用したOt株

Strains	Source	Type
Gilliam	Human	Gilliam
Ikeda	Human	JG
Karp	Human	Karp
Matsuzawa	Human	JP
Shibuya	Human	JP
Kato	Human	Kato
Kawasaki	Human	Kawasaki
Kuroki	Human	Kuroki
Shimokoshi	Human	Shimokoshi
LX-1	*Leptotormbidium* mite	LX
Fuji	*L. fuji*	Fuji

表3-2　Ot標準6株のマウスに対する毒力

Strains	接種量（ICU）	マウスの系統	LD_{50}
Gilliam	1.93×10^{6}	BALB/c	1.78×10^{1}
	9.12×10^{5}	ddY	$\geqq2.29\times10^{3}$
	4.47×10^{5}	C3H/HeJ	2.14×10^{1}
Karp	2.25×10^{6}	BALB/c	5.62×10^{3}
	1.38×10^{6}	ddY	2.14×10^{2}
	9.12×10^{6}	C3H/HeJ	3.16×10^{2}
Kato	1.07×10^{7}	BALB/c	1.07×10^{7}
	1.49×10^{6}	ddY	$\geqq3.16\times10^{5}$
	9.33×10^{5}	C3H/HeJ	3.16×10^{4}
Kawasaki	8.26×10^{5}	BALB/c	AL *
	8.32×10^{5}	ddY	AL
	3.98×10^{5}	C3H/HeJ	AL
Kuroki	1.49×10^{6}	BALB/c	AL
	2.24×10^{6}	ddY	AL
	8.71×10^{5}	C3H/HeJ	AL
Shimokoshi	5.76×10^{5}	BALB/c	AL
	4.90×10^{5}	ddY	AL

*：接種した全てのマウスが生残

91)。そこで、Gilliam、Karp、Kato、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshiの標準6株をBALB/cマウスに感染させてLD_{50}を算出し、すでに求められているddYとC3H/HeJマウスの値と比較した（表3-2)。6株の接種液の原液を10^{6}ICU前後に揃えた後、BALB/cマウスの腹腔に接種した。Gilliam、Karp、Katoの3株を接種したとき、10^{1}～10^{7}のLD_{50}の値を得た。この結果とddYおよびC3H/HeJマウスで得られた値を比較すると、殆ど差がないことが判った。これに対し、Kawasaki、Kurokiを接種したとき、BALB/c、ddY、C3H/HeJマウスは死亡せず、Shimokoshiを接種したときも、BALB/c、ddYマウスは生残した。即ち、ddYマウスで得られたLD_{50}の値は、BALB/cマウスのLD_{50}と同等な値であると思われる。

前章で、Karp、Gilliam、Kuroki、Kawasakiの4株で認められた、マクロファー

ジ内での増殖の可否と TNF 産生の有無との相関性が、他の分離株にも該当するかどうかを検証するため、表 3-1 に示す患者およびダニから分離された代表的な Ot 株を用い、マクロファージ中の増殖、感染細胞の TNF 産生について調べた。

各分離株をマクロファージに感染させたときの感染 4 日目のOtの増殖と感染6時間後における感染細胞のTNF産生量、およびマウスに接種したときのLD_{50}を表 3-3 に示した。LD_{50}を求めるために、Otの接種液はICUを 10^6前後に調製し、マウスへ接種した。ヒトから分離されたGilliam、Karp、Kato、Ikedaは、マクロファージ内で増殖し、その感染細胞のTNF産生量は検出限界以下であった。これらの株の接種原液を 10^1～10^7倍に希釈してもマウスは死亡した。これに対し、上記 4 株と同じくヒトから分離されたKawasaki、Kuroki、Shimokoshi、Matsuzawa、Shibuyaはマクロファージ中で増殖せず、且つそれらの感染細胞ではTNFの産生

表3-3　各0t株のマクロファージ内での増殖と感染細胞のTNF産生およびマウスに対する毒性

Strains	Growth [1)]	TNF [2)]	LD_{50}	Type
Gilliam	＋	－	1.78×10^{1} [3)]	G
Karp	＋	－	5.62×10^{3} [3)]	KP
Kato	＋	－	1.00×10^{6} [3)]	KT
Ikeda	＋	－	1.07×10^{7} [3)]	JG
Kawasaki	－	162.4±13.2	AL [4)] [3)]	KW
Kuroki	－	120.5±12.1	AL [3)]	KR
Shimokoshi	－	81.2± 3.3	AL [3)]	S
Matsuzawa	－	123.4±12.7	AL	JP
Shibuya	－	73.4±3.5	AL	JP
Fuji	－	83.4±10.3	AL	Fuji
LX-1	－	73.1±5.6	AL	LX

1) 感染4日後の増殖性； ＋：増殖する、－：増殖しない
2) 感染6時間後のTNF産生量、－：<20 units/mL
3) BALB/cマウスでの値、これ以外はddYマウスでの値
4) AL：接種した全てのマウスが生残

が認められた。ツツガムシから分離されヒトや野鼠からは同型のOtが分離され

たことのないLX-1、Fujiも、マクロファージ中で増殖せず、TNFの産生が認められた。これらの株をマウスに接種してもマウスはすべて生残した。以上の結果から、強毒株はマクロファージ中で増殖し、TNFの産生を誘導せず、弱毒株は増殖せず、TNF産生を誘導するという相関性は前章までの 4 株に加え、本章で行った 7 株を加えても該当することが示された。

3-2　考察

本章で用いた 11 株については既にC3H/HeJまたはddYマウスによるLD_{50}が求められている。本研究はBALB/cを用い、*in vitro*で用いるマクロファージもBALB/cマウスから調製するため、マウスの系統間で毒力の違いがないかを確認することが必要である。そこで、標準株であるGilliam、Karp、Kato、Kawasaki、Kuroki、ShimokoshiのBALB/cマウスに対するLD_{50}を求め、C3H/HeJやddYマウスで得られた値と比較した。その結果、Karp、Kato、Kawasaki、Kuroki、ShimokoshiのBALB/cでのLD_{50}は、既に明らかになっているC3H/HeJやddYマウスと殆ど変わらず、Karp、Kato、は接種液を 10^2～10^6倍に希釈してもマウスを殺し、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshiは接種液の原液を接種してもマウスは死亡しなかった。この結果は、Ot株の毒力はマウスの系統が変わっても殆ど変わらないことを示唆している。

Gilliamを低感染価でBALB/cとC3Hマウスに接種すると、BALB/cが生残する（56）。今回LD_{50}を求めるため、上記実験の場合よりも約 1000 倍量の接種原液を用いている。そのため、BALB/c、C3Hマウスで得られたLD_{50}は、どの株の感染でも殆ど変化がなかった。すべての株のBALB/cでのLD_{50}を求める必要があるが、おそらくは、既に得られているddYでのLD_{50}をその代わりに用いても、大きな間違いはないものと考える。

患者およびツツガムシから分離された株が Ot には多数存在し、これらをマウスに接種したとき、強毒と弱毒とに分けられる。第二章で見出されたマウスに対する毒力の強弱とマクロファージ内での増殖の有無、および感染マクロファージによる TNF の産生との相関性について株数を合計 11 に増やして検証した。

マクロファージ中で増殖する株を感染させた時の、マクロファージの TNF 産生は検出限界以下であった。そしてこれらの株はすべてマウスに対して強毒性を示した。これに対し、マクロファージ中でも増殖せず、且つ TNF 産生が認められた株は、マウスに対して弱毒性を示した。即ち、前章で認められたマウス

に対する毒力とマクロファージ内の増殖および TNF 産生の有無の相関性は、この 11 株の観察でも保持された。従って、Ot の毒力を決定する因子が TNF の産生誘導に関与しているものと考えられた。

これまでの型別では、Gilliam、Karp、Kato、Kawasaki、Kuroki、Shimokoshi の何れかに分けられてきた。古くは Gilliam、Karp、Kato 型の何れかに分類されていたが、その後 1980 年代に分離された株の殆どは Kawasaki、Kuroki 型に分けられた。この新しい型の発見とそれらがマウスに対して弱毒であったことから、抗原性と毒力の関係に注目が集まった。また、ポリクローナル抗体との反応性から Karp 型と分類されていた日本の分離株は、Karp と異なり弱毒であり、「型ごとの毒力は一定」という仮説に矛盾を生じていた。しかし分子遺伝学、免疫学的技術の進展に伴い、日本の Karp 型は標準型である Karp 株とは型特異的蛋白のアミノ酸配列もモノクローナル抗体に対する反応性も異なることが判り、JP 型として独立した型とされた（40)。これにより、Gilliam、Karp、Kato、JG 型は強毒、JP、Kuroki、Kawasaki、Shimokoshi 型は弱毒という分類が成立した。これらに加え、当研究室で Fuji がフジツツガムシから分離された (91)。LX-1 は、アラトツツガムシから分離された LI-1（97）と型特異蛋白のアミノ酸配列が同一である株である。これらは、どの型にも属さない独立した型であり、且つ弱毒であった。

以上のことを考察すると、抗原型が Gilliam、Karp、Kato の 3 型しか認識されていなかった時代には、弱毒株を分離する方法がなかったので、Ot はすべて強毒と考えられていた。しかし、弱毒株を分離する方法が開発されるのと、抗原型を詳細に分析できるようになったのがほぼ同時であったため、それまで分離されていなかった弱毒株は、すべて抗原型が新規なものであった。この事例から「抗原性が異なると、毒力が異なる」、「抗原型決定因子と毒力因子とは関連している」という推察がなされるようになったと解釈できる。まだ証明されてはいないが、抗原型物質である 56kDa 蛋白の一次構造と毒力とに相違は見られないという見解がある。本章の結果から、毒力因子を特定することはできないが、おそらくは 56kDa 蛋白とは異なる因子が、TNF の産生誘導の有無を決定しているように思われる。

第四章　*O. tsutsugamushi* の TNF 産生因子の検索

細菌などの感染によって、マクロファージはTNFなどの炎症性サイトカインを分泌することが知られている。その一方で、*Ehrlichia*（98）や*Yersinia*（99）は、感染に際して発動するシグナル伝達をdown regulateすることで、細胞内での増殖が可能としている。前章までの結果より、Otの弱毒株と強毒株のTNF誘導能の違いは、弱毒株に誘導能があるか、強毒株に本来生じるはずのTNFの誘導を阻害する因子が存在するかのいずれかと考えることができる。Kim等はOtの感染によるTNFの誘導を解析し、熱不活化した菌体にもマクロファージに対してTNF誘導能があることを明らかにした（83）。補体反応の分解産物であるC5aと呼ばれるペプチドが食細胞を活性化し、TNF α を分泌させる。また、近年toll-like受容体とそのリガンドが多数発見され、リポ多糖、ペプチドグリカンなどの菌体成分が受容体に結合することにより、TNFなどのサイトカインを産生することが明らかとなってきた（100）。OtによるTNFの誘導が死菌体でも起こるとすれば、toll-like受容体のリガンドと類似の作用もつ物質をOtが保有している可能性がある。

そこで本章では Ot の TNF 誘導能の物質的根拠を探索するため、まず始めに強毒株と弱毒株を熱不活化した上でマクロファージに接種し、TNF 産生の誘導があるか否かを比較した。それに続いて、それぞれの菌体のどの成分に TNF を誘導する活性があるのかの解析を試みた。ハトのアレルギー性肺炎の抗原物質を解析するために、Mendoza 等は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動でハトの排泄物を分画後、ニトロセルロース膜に転写し、どの画分が患者の白血球と反応するかを調べている（101）。本章ではこの方法を改変し、強毒の Karp と Gilliam および弱毒の Kuroki と Kawasaki の構成成分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分画後、ニトロセルロース膜に転写した。膜を等分割し、各画分をマクロファージに接種した後の TNF の産生の有無を調べた。

4-1　材料と方法

宿主細胞

マウス腹腔滲出マクロファージは第一章の方法に従い調製し、Lab-Tek 4 chamber slideの各well上で 5% CO_2存在下、37℃で培養した。

Otの培養

Gilliam、Karp、KawasakiおよびKurokiを使用した。その培養は第一章の方法に従いL929細胞中で培養した。

Otの熱不活化

Gilliam、Karp、Kawasaki および Kuroki の接種液は、第一章の方法にそって感染 L929 細胞より調製した。Ot 感染細胞を PBS で懸濁後、ダウンスホモジナイザーでホモジナイズした。200×g で 10 分間遠心後の上清を 56℃、20 分処理した。次に 10000×g で 5 分間遠心し、熱処理した菌体を回収後、10%FBS 含有 RPMI 培地に再浮遊させ接種液とした。

Otの精製

Ot の精製は感染 L929 細胞より行い、Tamura 等（20）のパーコール密度勾配遠心法によった。

電気泳動法およびニトロセルロース膜への転写

SDS-電気泳動法は Laemmli の方法で行った。精製した Ot は 2%SDS、10%グリセロール、5%メルカプトエタノール、0.001%ブロムフェノールブルー含有 62.5mM Tris-HCl 緩衝液（pH6.8）中で 100℃、10 分間の加熱処理により可溶化した。泳動用のゲルは、濃縮ゲルとしてアクリルアミド濃度が 4.5%、分離ゲルとしてアクリルアミド濃度が 10%のものを使用した。泳動装置は Bio-Rad 社製 mini PROTEAN II を用いた。泳動緩衝液は 192mM グリシン、0.1%SDS 含有 25mM Tris-HCl を用いて 200V、45 分間泳動した。泳動後のゲルはニトロセルロース膜と重ねて 20%メタノール含有、25mM Tris、195mM グリシン溶液中に浸し、構成成分を膜上に転写した。

Ot構成成分の分画および接種液の調製

Ot 構成成分の分画接種液は Steinitz 等の方法（102）によった。上記、Ot 構成成分を転写したニトロセルロース膜を泳動距離に沿って 17 に分割し、それぞれを DMSO に溶解した後、重炭酸ナトリウム-炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.5）で微粒子（平均粒子 2μm）として析出させた。粒子となったニトロセルロースを PBS で洗浄した後、10%FBS 含有 RPMI 培地に再浮遊させ接種液とした。

*In vitro*でのマウスのマクロファージへの感染実験

Chamber slide上に調製したマクロファージに熱不活化したOt、または分画した接種液を 0.25ml接種し、5%CO_2存在下、37℃で 2 時間培養した。その後、細胞表面を培養液で洗い、新しい培養液を 0.5ml添加して 5%CO_2存在下、37℃で培養した。任意の時間に培養液を回収した。

TNF測定法

マクロファージの培養上清中の TNF の測定は、第二章の方法によった。

4-2　結果

表4-1　熱不活化Ot接種後の *in vitro* マウス滲出マクロファージのTNF産生

	Ｋａｒｐ	Gilliam	Kuroki	Kawasaki
未処理	— [1)]	—	96.1±17.0	105.6± 8.5
熱処理 [2)]	—	—	115.6±18.5	234.1±36.0

1）検出限界（20units/mL）以下
2）未処理の場合の10倍濃いOt接種液を56℃、10分間処理して接種

4-2-1　熱不活化 Ot の TNF 産生

菌体成分を分画する前に、Ot の死菌によって TNF の産生があるか否かを調べるため、56℃で 20 分間、熱処理した死菌をマクロファージに接種し、6 時間後の TNF の産生量を測定した。死菌は生菌の接種量の 10 倍濃いものを用いた。その結果を表 4-1 に示す。マクロファージに Gilliam または Karp の死菌を接種した場合、培養上清中の TNF は検出限界以下であった。一方、Kawasaki または Kuroki の死菌を接種した場合、TNF の産生が認められた。従って、強毒株の死菌または生菌の接種でマクロファージは TNF を産生せず、弱毒株は、死菌でもマクロファージに TNF を産生させる因子を持っていること、およびその因子は熱による変性に安定な物質であることが示唆された。

4-2-2　Ot 構成成分の画分の TNF 産生誘導

精製した Ot を SDS-PAGE で分画し、ニトロセルロース膜に転写後、図 4-1 右のように膜を分割して、それぞれの画分から得た微粒子をマクロファージに接種した。マクロファージに Gilliam または Karp の分画を接種した場合、どの画分を接種しても培養上清中に TNF は検出できなかった。一方、Kawasaki、Kuroki の各分画を接種した場合、画分 9（43-47kDa 付近）および画分 17（泳動末端部分）に TNF 誘導の活性を認めた（図 4-2)。同様の方法でニトロセルロース膜のみを接種しても TNF は検出されなかった。

この結果から、弱毒株のが有する TNF を誘導する因子として 43-47kDa 付近と電気泳動の末端部分に泳動される物質が挙げられた。

4-3　考察

強毒株である Gilliam、Karp の死菌およびそれを SDS-PAGE で分画した画

QuickTimeý Ç²
TIFFÂiLZWÃj êLíÉÉvÊçÉOÉâÉÃ
Ç™Ç±ÇÃÉsÉNÉ`ÉÉÇ¾â©ÇÈÇžÇ½Ç…ÇÕïKóvÇ-Ç ÅB

図 4-1　Ot の SDS-PAGE パターンと分画位置

KP; Karp, G; Gilliam, KR; Kuroki, KW; Kawasaki

左は Ot の主要な蛋白の分子量、右は分割箇所を示す。

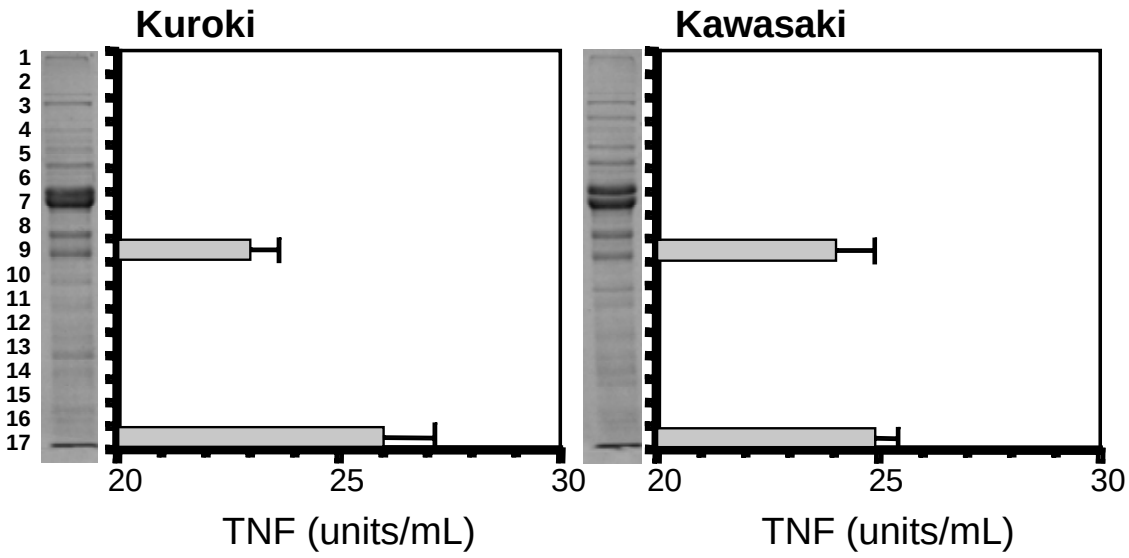


図 4-2　Kuroki、Kawasaki の各分画を *in vitro* マウス腹腔滲出マクロファージに接種したときの TNF 産生

グラフ縦軸の目盛りは図 4-1 の分割箇所を示す。

分をマクロファージに接種しても、分泌される TNF は検出限界以下であった。弱毒株である Kawasaki、Kuroki の死菌およびその各画分を接種した場合には TNF が誘導され、分画としては 43-47kDa の付近と泳動末端部分に誘導能があることが判明した。弱毒株の死菌を接種することによる TNF は、生菌の接種量より 10 倍濃いものを用いたときに認められた。即ち、死菌の接種では、生菌の接種よりも TNF 量は少ないことが示唆された。また、43-47kDa の画分と泳動末端の画分をマクロファージへ接種したときの TNF 量も、生菌を接種した場合より低い。これらは熱や SDS の変性に不安定なものの存在を示している。以上の結果から、Ot が TNF を誘導する機構の一部が明らかになったと考える。

Kim 等は、Ot の生菌と熱不活化菌の両方をマクロファージへ接種すると、どちらの接種細胞も TNF を産生し、熱に安定な物質が TNF を誘導していると報告している（83）。著者の行った弱毒性の 2 株による結果も、56℃で処理した菌体を接種したとき、TNF が誘導されている。TNF の誘導能のある分画は 43-47kDa 付近と泳動末端部分にあり、これらが誘導物質を含んでいると考える。

自然免疫は感染初期の病原体を認識し、迅速に応答する。その中に Toll-like receptor (TLR) family があり、TLR が様々な病原菌に対して応答している報告がある（103, 104, 105, 106, 107）。一般に TLR4 はグラム陰性菌の LPS、ペプチドグリカンに反応して TNF や IL-12 を産生させることが知られ、細胞内寄生菌では、*Clamydia* の誘導する TNF の分泌は抗 TLR-4 抗体により抑制される（108）ことが報告されている。*Mycobacterium*（103）、*Legionella*（105）を感染させた TLR4 および TLR2 を欠損した細胞では、TNF は誘導されないため、菌の増殖を認めるが、野生株への感染では TLR の応答により TNF は誘導され、菌の増殖が抑制された。Ot にはペプチドグリカンや LPS の構成成分であるムラミン酸、グルコサミン、ヘプトース、3-deoxy-D-mannoocutolosonic acid が検出されない（32）。しかし、マクロファージに接種した数時間後には、Kuroki および Kawasaki が死菌でも TNF は産生されることから、弱毒株はペプチドグリカンに類似のものや短い糖鎖などの TLR に反応する構造を有していると考えられる。

本章の結果より、Kuroki、Kawasaki には TNF を誘導する物質を有しており、それは Gilliam、Karp には含まれない、株もしくは型特異的な性質を持つものであることが明らかとなった。型特異抗原蛋白である 56kDa 蛋白以外にも、型に特異的な抗原性をもつ蛋白が Ot の菌体表層に検出されており（109, 110）、そのひとつは SDS-PAGE で 43-47kDa 付近に泳動される。また、Oaks 等は Karp の抗

原蛋白遺伝子について Gilliam と Kato の染色体 DNA を用いたサザンブロット解析を行い、3 株の RFLP パターンの比較から、150-、110-、58-、56-、47-および 20-kDa 蛋白遺伝子は多様性を示すことを明らかにした (111)。今回見いだされた因子のひとつの泳動距離と一致しており、興味が持たれる。もうひとつの因子である泳動末端部分は、今回の泳動条件では 20kDa の蛋白を含むため、43-47kDa 部分と共に興味ある画分と考える。

以上のように Ot 構成成分を分画したものの中に TNF を誘導する物質が含まれることがわかった。TNF を誘導する分画には様々なものが混在している。現在、Ot のゲノム解析が進められている。ゲノム配列の全容が明らかになれば、マススペクトル解析により、TNF を誘導する物質の詳細が明らかになると思われる。また、宿主と Ot の相互作用や病原因子が解明できるものと期待する。

総　括

Ot には血清型を異にする variant が多数存在し、これらの Ot をマウス腹腔内に接種したとき、マウスが死亡する強毒株と殆ど症状を示さない弱毒株とに大別される。古くから、分離株は Gilliam、Karp、Kato に代表される血清型のいずれかに型分けされ、マウスに対して強毒性を示した。しかし、1980 年代に分離された株の殆どは上記 3 株のいずれにも属さない血清型であり、かつ弱毒であった。血清型を決定する因子は、Ot 表面に多量に存在する単一の分子量 56kDa の蛋白であることが明らかにされたが、Ot の毒力の強弱に関与する因子については全く不明であった。本研究では、Ot の株ごとに異なる毒力の根拠を探索した。

Ot の強毒株と弱毒株とでは、*in vivo*、 *in vitro* でのマウスのマクロファージ中での増殖の良否が大きく異なり、この差異がマウスの生死を分けている可能性のあることを第 1 章で示した。第 2 章では、マクロファージ中で増殖する Ot 株は TNF を誘導しないが、増殖しない株では、感染初期にマクロファージが TNF を産生した。強毒株に感染したマクロファージの培養液に recombinant TNF の濃度が一定以上に保たれている間は、強毒株の増殖が大きく抑制された。弱毒株の感染では、TNF を中和することによって弱毒株の増殖は促進された。これは、感染後の TNF 産生の有無が Ot の増殖の可否に大きく関わっていることを示すものである。第 3 章で対象を 11 株に広げ、マウスに対する毒力と感染時にマクロファージが TNF を産生するか否かを解析したところ、TNF 産生と毒力とが例外なく一致した。この事実は、TNF を誘導する因子が Ot の毒力と不可分に結びついていることを強く示唆している。また、第 2 章で TNF 中和抗体を用いても、弱毒株の増殖速度は強毒株の速度に及ばないため、Ot の増殖に関わると考えられる TNF 以外の因子も、TNF を誘導する別の要因によって調節されていると思われる。以上のことから、強毒株にはマクロファージに TNF の産生を抑制する因子があるか、または、弱毒株は TNF 産生を促す因子を持っていると考えることもできる。第 4 章では、その仮説に沿って研究を行った。熱で処理した死菌を接種することによる TNF 誘導は、強毒株には見出せず、弱毒株に認められた。TNF の誘導には、熱に安定な菌体分子が関係し、その分子が SDS-PAGE における 43-47kDa 画分と泳動末端画分に含まれることが明らかとなった。

抗原型と毒力について、二つの性質に相関があるという議論がかつてあった。弱毒株の発見と同時期に、モノクローナル抗体や遺伝子解析による抗原性の分類技術の進展があった。そのため、かつては Gilliam、Karp、Kato の 3 つの型に

しか分類できなかったものが、現在では十数種の抗原型に分けられている（40, 91, 92, 95）。Kawasaki、Kuroki 型の株は、少数ではあるが以前から分離はされていたものの（91）、ポリクローナル抗体による型分けでは、Gilliam、Karp の変種として扱われていた。これらの株が免疫抑制マウスを用いることにより分離が可能であることが判かり（42）、多数分離されるようになった。時を同じくして、これらの株は詳細な抗原分析により Gilliam、Karp から独立したため、「新型は弱毒」、「型ごとの毒力は一定」ということが喧伝されるようになった。しかし、本研究で、マクロファージでの増殖の可否、TNF の誘導能とそれぞれの株の毒力は相関性を示すが、型特異蛋白の構造と毒力に相関は見出せず、今回 TNF 誘導能に関係することが示唆された蛋白は、株特異性があっても、抗原型を決定する因子ではない。毒力には強毒と弱毒の 2 種しかなく中間型が殆どない。Kim 等の私信によれば、56kDa 蛋白のアミノ酸配列は、その遺伝子の塩基配列よりも変異が大きい。通常の蛋白遺伝子では silent mutation などにより、変異率は遺伝子の方が大きい。即ち、この事実は 56kDa 蛋白には、一次構造を変える方向に淘汰圧が働いていることを示している。毒力は Ot の進化の過程で変化が乏しいとすれば、より変化の激しい抗原型蛋白が決定する型の中では毒力が均一であっても不思議ではないと思われる。

各抗原型の株の日本における分布を見ると、JG、JP 型は新潟、秋田で、Kawasaki、Kuroki 型は宮崎で、JP、Kawasaki、Kuroki 型は静岡や岐阜でそれぞれ見られる（40）。このような各流行地での型の分布とベクターであるツツガムシの地理的分布とに、フトゲツツガムシには JP、JG 型が、タテツツガムシには Kawasaki、Kuroki 型が、アカツツガムシには Kato 型が共生しているという相関が認められている。また、その相関の通りの型が各種のツツガムシから分離されている。ツツガムシは幼虫のときに一度だけヒトや野鼠を含めた温血動物に寄生するのみで、繰り返し寄生しない。従って Ot はヒトからヒトへの水平伝播は起こらず、ツツガムシでの Ot の伝播は卵を介した垂直伝播のみである（10）。型特異蛋白の役割については未だ判かっていないが、唯一それを示唆するものが、宿主となるツツガムシの種ごとに共生する Ot の型がほぼ決まっていることである。Ot は宿主の細胞質中に侵入しながら、*Chlamydia* や *Ehrlichia* の様に膜で仕切られた空胞もなく、*Rickettsia* のような slime layer もない（15）。Ot はその表面を宿主の細胞質に直接接しているため、宿主の種ごとに Ot 自身の表面構造を変化せざると得ず、型特異蛋白の抗原性がツツガムシの種ごとに変化するのではないかと考

える。

長年議論されてきた「Ot の抗原型と毒力との関係」が真実であるとすれば、毒力に関与する物質は型特異抗原蛋白である可能性が非常に高い。なぜなら、この蛋白は Ot の蛋白総量の約 20%を占め、菌体表面に露出し、抗原性が高い。そして、抗原型はこの蛋白の構造によりほぼ決定されているからである（43, 25)。この蛋白以外にも株間に変異がある蛋白は、110kDa、43kDa 蛋白などいくつか見出されているが（109, 111)、その抗原性が抗原型に与える影響は大きくない。著者の結果は、Ot の毒力に大きく関与する TNF の誘導能を有する物質は、43-47kDa 部分と泳動末端部分にあり、型特異抗原蛋白が泳動される 56kDa 近辺には活性を認めなかった。Karp の 46kDa と 56kDa の fusion 蛋白をマウスに投与した後、Karp の感染に抵抗性を示すことがあるため（112)、必ずしも 56kDa 蛋白の毒力への関与を否定するものではないが、56kDa 蛋白の一次構造と毒力との間には、明確な相関は認められない（大橋、私信）ことを考えると、抗原型と毒力を関連づける必要はないものと思われる。現在、本菌のゲノム解析が日本、アメリカ、韓国で進められている。強毒株と弱毒株のゲノム配列が明らかになれば、将来的に宿主と Ot の相互作用や病原因子が解明できると期待している。

Ot の株によって大きく異なる毒力は、マクロファージ中での増殖の良否に依存し、その差異は TNF の産生誘導の有無によって起こることが明らかとなった。Ot の TNF 誘導には、熱に安定な Ot の分子が関係し、その分子を示すことができた。これらは本研究により初めて明らかになった知見であり、Ot の毒力の差異という Ot 研究上の長年の疑問に免疫学的、分子生物学的にひとつの答えを出すことができたと考える。

謝辞

本研究に際して、終始御指導を賜り、且つ本論文の作成する機会をお与え下さいました新潟薬科大学・多村 憲名誉教授、中村辰之介教授、並びに千葉大学大学院薬学研究院・山本友子教授に心より深謝致します。

数々の御助言、御援助下さいました新潟薬科大学・浦上　弘助教授、静岡県立大学・大橋典男助教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に対し、多大なる御協力を頂きました新潟薬科大学・島田雅彦氏、小山洋子氏、深澤昌弘氏、江夏照晋氏、小山正一郎氏、槇坂幸恵氏に深く感謝致します。

参考文献

1. Nagayo, M., Tamiya, T., Mitamura, T., Sato, K.: On the virus of Tsutsugamushi disease and its demonstration by a new method. Trans. Japan. Pathol. Soc. 20, 556-566 (1930)
2. Ogata, N.: Aetiologie der Tsutsugamushikrankheit: *Rickettsia tsutsugamushi*. Zbl. f. Bakt., (1 Abt.), Orig. 122, 249-253 (1931)
3. 多村憲：恙虫病病原体 *Orientia tsutsugamushi* の微生物学. 日本細菌学雑誌 54, 815-832 (1999)
4. Tamiya, T.: Recent advances in studies of Tsutsugamushi disease in Japan. Tokyo, Medical Culture Inc. (1962)
5. 浅沼靖: 媒介ツツガムシと恙虫病リケッチアの保有種. 臨床と細菌 10, 174-179 (1983)
6. 川村明義: リケッチア症　特につつがむし病について. モダンメディア 30, 310-339 (1984)
7. Takahashi, M., Machida, K., Murata, M., Misumi, H., Hori, E., Kawamura, A. Jr., Tanaka, H.: Seasonal development of Leptotrombidium pallidum (Acari: Trombiculidae) observed by experimental rearing in the natural environment. J. Med. Entomol. 30, 320-325 (1993)
8. 伊藤辰治、小俣義男: 新潟県の恙虫及び恙虫病, 新潟, 新潟県衛生部 (1961)
9. Jones, B. M.: The penetration of the host tissues by the harvest mite, Trombicula autumnalis Shaw. Parasitol. 40, 247-260 (1950)
10. Urakami, H., Takahashi, M., Murata, M., and Tamura, A.: Electron microscopic study of the distribution and the vertical transmission of *Rickettsia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium pallidum*. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **47**: 127-139 (1994)
11. 須藤恒久: 恙虫病の現状とその迅速診断法. 日本医事新報 3034, 43-49 (1982)
12. 須藤恒久: 間接免疫ペルオキシダーゼ法による恙虫病の迅速血清診断法. 臨床病理 30, 10-17 (1982)
13. 山本正悟、川畑紀彦、大浦恭子、村田道里、南嶋洋一: 宮崎県における恙虫病患者由来の *Rickettsia tsutsugamushi* の抗原型とその分布. 感染症学雑誌 63, 109-117 (1989)

14. Woodman, D. R., Grays, R., and Weiss, E.: Improved chicken embryo cell culture plaque assay for scrub typhus rickettsiae. J. Clin. Microbiol. 6, 639-641 (1977)
15. Uramaki, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A.: Electron microscopic studies on intracellular multiplication of *Rickettsia tsutsugamushi* in L cells. Microbiol. Immunol. 28, 1191-1201 (1984)
16. Moree, M. F., and Hanson, B.: Growth characteristics and proteins of plaque-purified strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. Infect. Immun. 60, 3405-3415 (1992)
17. Tamura, A, and Urakami H.: Easy method for infectivity titration of *Rickettsia tsutsugamushi* by infected cell counting. Nippon Saikingaku Zasshi 36, 783-785 (1981)
18. Dasch, G. A., and Weiss, E.: Characterization of the Madrid E strain of *Rickettsia prowazekii* purified by renografin density gradient centrifugation. Infect. Immun. 15, 280-286 (1977)
19. Weiss, E, Coolbaugh, J. C., and Williams, J. C.: Separation of viable *Rickettsia typhi* from yolk sac and L cell host components by renografin density gradient centrifugation. Appl. Microbiol. 30, 456-463 (1975)
20. Tamura, A., Urakami, H., and Tsuruhara, T.: Purification of *Rickettsia tsutsugamushi* by Percall density gradient centrifugation. Microbiol. Immunol. 26, 321-328 (1982)
21. Tsuruhara, T., Urakami, H., and Tamura, A.: Surface morphology of *Rickettsia tsutsugamushi*-infected mouse fibroblast. Acta Virol. 26, 506-511 (1982)
22. Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A.: Intracuclear *Rickettsia tsutsugamushi* in cultured mouse fibroblasts (L cells). Microbiol. Immunol. 26, 445-447 (1982)
23. Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A.: Observations of the same whole cells infected with *Rickettsia tsutsugamushi* by means of transmission and scanning electron microscopy. J. Electron Microscopy 31, 212-215 (1982)
24. Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A.: Penetration of *Rickettsia tsutsugamushi* into cultured mouse fibroblasts (L cells): an electron microscopic observation. Microbiol. Immunol. 27, 251-263 (1983)
25. Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Takahashi, K., and Oyanagi, M.: Analysis

of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. Infect. Immun. 48, 671-675 (1985)

26. Tamura, A., Urakami, H., and Ohashi, N.: A comparative view of *Rickettsia tsutsugamushi* and the other groups of rickettsiae. Eur. J. Epidemiol. 7, 259-269 (1990)
27. Silverman, D. L., and Wisseman, C. L. Jr.: Comparative ultrastructural study on the cell envelopes of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia tsutsugamushi*. Infect. Immun. 21, 1020-1023 (1978)
28. Schramek, S., Brezina, R., and Kazar, J.: Some biological properties of an endotoxic lipopolysaccharide from the typhus group rickettsiae. Acta Virol. 21, 439-441 (1977)
29. Amano, K., Fujita, M., and Suto, T.: Chemical properties of lipopolysaccharide from spotted fever group rickettsiae and their common antigenicity with lipopolysaccharides from *Proteus* species. Infect. Immun. 61, 4350-4655 (1993)
30. Allison, A. C., and Perkins, H. R.: Presence of cell walls like those of bacteria in *Rickettsia*. Nature 188, 796-798 (1960)
31. Myers, W. F., Ormsbee, R. A., Osterman, J. V., and Wisseman, C. L. Jr.: The presence of diaminopimelic acid in the rickettsiae. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 459-462 (1967)
32. Amano, K., Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Kaya, S., and Fukushi, K.: Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*, Infect. Immun. 55, 2290-2292 (1987)
33. Ohashi, N., Fukuhara, M., Shimada, M., and Tamura, A.: Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiol. Lett. 125, 299-304 (1995)
34. Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., and Miyamura, S.: Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov. as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 589-591 (1995)
35. Shishido, A., Hikita, M., Sato, T., and Kohno, S.: Particulate and soluble

antigens of *Rickettsia tsutsugamushi* in the complement fixation test. J. Immunol. 103, 480-490 (1969)

36. Shishido, A., Kono, S., Hikita, M., Iida, T., and Kawashima, H.: Complement fixation and direct immunofluorescence for typing of tsutsugamushi disease rickettsia. Acta Med. Biol. Niigata 15, 87-95. (1967)
37. Yamamoto, S., Kawabata, N., Tamura, A., Urakami, H., Ohashi, N., Murata, M., Yoshida, Y., and Kawamura, A. Jr.: Immunological properties of *Rickettsia tsutsugamushi,* Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. Microbiol. Immunol. 30, 611-20 (1986)
38. Ohashi, N., Tamura, A., Sakurai, H., and Yamamoto, S.: Characterization of a new antigenic type, Kuroki, of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from a patient in Jpn. J. Clin. Microbiol. 28, 2111-2113 (1990)
39. Tamura, A., Takahashi, K., Tsuruhara, T., Urakami, H., Miyamura, S., Sekikawa, H., Kenmotsu, M., Shibata, M., Abe, S., and Nezu, H.: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. Microbiol. Immunol. 28, 873-882 (1984)
40. Ohashi, N., Koyama, Y., Urakami, H., Fukuhara, M., Tamura, A., Kawamori, F., Yamamoto, S., Kasuya, S., and Yoshimura, K.: Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. Microbiol. Immunol. 40, 627-638 (1996)
41. 緒方規雄、中島元徳、鹿島宗逸: 各種病原「リケッチア」の実験動物に就いて（特に「リケッチア・ツツガムシ」の検出に「マウス」を推賞す）. 東京医事新誌 2760, 155-160 (1932)
42. Kobayashi, Y., Tachibana, N., Matsumoto, I., Oyama, T., and Kageyama, T.: Isolation of very low virulent strain of *Rickettsia tsutsugamushi* by the use of cyclophosphamide-treated mice. p181-188, In Kazar, I., Ormsbee, R. A., Tarasevich, I. N. (eds), Rickettsiae and rickettsial diseases. VEDA Publ. House, Slovak Akad. Sci., Bratislava. (1978)
43. Murata, M., Yoshida, Y., Osono, M., Ohashi, N., Oyanagi, M., Urakami, H., Tamura, A., Nogami, S., Tanaka, H., and Kawamura, A. Jr.: Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype

strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. Microbiol. Immunol. 30, 599-610 (1986)
44. 與謝野光、山口與四郎、山下 章、井之川孝雄、池田和雄、難波諄士、岩崎綾子、田中和義、中田英吉: 七島熱の疫学的観察. 七島熱の調査研究 東京都 9-39 (1952)
45. Kawamura, A. Jr., Murata, M., Osono, M., Nogami, S., Shirasaka, A., Tanaka, H., Sudo, K., Suzuki, K., Miyairi, T, and Kijima, H.: Sutadies on inapparent infection of Tsutsugamushi disease in Izu Shichito Ilands; seroepidemiology and demonstration of an avirulent rickettsia strain for mice. Jpn. J. Exp. Med. 50, 91-105 (1980)
46. Fan, M-Y., Walker, D. H., Yu, S-R., and Liu, Q-H.: Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the People's Republic of China. Rev. Infect. Dig. 9, 823-840 (1987)
47. Hanson, B.: Comparative susceptibility to mouse interferons of *Rickettsia tsutsugamushi* strains with different virulence in mice and of *Rickettsia rickettsii.* Infect. Immun. 66, 4134-4141 (1991)
48. Nacy, C. A., and Groves, M. G.: Macrophages in resistance to rickettsial infections: early host defense mechanisms in experimental scrub typhus. Infect. Immun. 31, 1239-1250 (1981)
49. Groves, M. G., and Osterman, J.V.: Host defenses in experimental scrub typhus: genetics of natural resistance to infection. Infect. Immun. 19, 583-588 (1978)
50. Groves, M. G., Rosenstreich, D. L., Taylor, B. A., and Osterman, J. V.: Host defenses in experimental scrub typhus: mapping the gene that controls natural resistance in mice. J. Immunol. 125, 1395-1399 (1980)
51. Patarca, R., Freeman, G. J., Singh, R. P., Wei, F. Y, Durfee, T., Blattner, F., Regnier, D. C., Kozak, C. A., Mock, B. A., and Morse, H. C.: Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. J. Exp. Med. 170, 145-161 (1989)
52. Singh, R. P., Patarca, R., Schwartz, J., Singh, P., and Cantor, H.: Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages *in vitro* and its effect upon macrophages *in vivo*. J. Exp. Med. 171, 1931-1942 (1990)

53. Shirai, A, Catanzaro, P. J., Phillips, S. M., and Osterman, J. V.: Host defenses in experimental scrub typhus: role of cellular immunity in heterologous protection. Infect. Immun. 14, 39-46 (1976)
54. Nacy, C. A., and Osterman, J. V.: Host Defenses in Experimental Scrub Typhus: Role of Normal and Activated Macrophages. Infect. Immun. 26, 744-750 (1979)
55. Catanzaro, P. J., Shirai, A., Hilderbrandt, P. K., and Osterman, J. V.: Host defenses in experimental scrub typhus: histopathological correlates. Infect. Immun. 13, 861-875 (1976)
56. Yun, J. H., Koh, Y. S., Lee, K. H., Hyun, J. W., Choi, Y. J., Jang, W. J., Park, K. H., Cho, N. H., Seong, S. Y., Choi, M. S., and Kim, I. S.: Chemokine and cytokine production in susceptible C3H/HeN mice and resistant BALB/c mice during *Orientia tsutsugamushi* infection. Microbiol. Immunol. 49, 551-557 (2005)
57. Kobayashi, Y., Kawamura, S., and Oyama, T.: Immunological studies of experimental Tsutsugamushi disease in congenitally athymic (nude) mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 568-577 (1987)
58. Ewing, E. P. Jr., Takeuchi, A., Shirai, A., and Osterman, J. V.: Experimental infection of mouse peritoneal mesothelium with scrub typhus rickettsiae: an ultrastructural study. Infect. Immun. 19, 1068-1075 (1978)
59. Rikihisa, Y., and Ito S.: Entry of *Rickettsia tsutsugamushi* into polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 38, 343-350 (1982)
60. Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A.: Electron microscopic studies on intracellular multiplication of *Rickettsia tsutsugamushi* in L cells. Microbiol. Immunol. 28, 1191-1201 (1984)
61. Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A.: Penetration of *Rickettsia tsutsugamushi* into cultured mouse fibroblasts (L cells): an electron microscopic observation. Microbiol. Immunol. 27, 251-263 (1983)
62. Koh, Y. S., Yun, J. H., Seong, S. Y., Choi, M. S., and Kim, I. S.: Chemokine and cytokine production during *Orientia tsutsugamushi* infection in mice. Microb. Pathog. 36, 51-57 (2004)
63. Cho, N. H., Seong, S. Y., Huh, M. S., Han, T. H., Koh, Y. S., Choi, M. S., and Kim, I. S.: Expression of chemokine genes in murine macrophages infected with

Orientia tsutsugamushi. Infect. Immun. 68, 594-602 (2000)
64. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B.: Interleukin-8 and relatedchemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. Adv. Immunol. 55, 97-179 (1994)
65. Geng, P., and Jerrells, T. R.: The role of tumor necrosis factor in host defense against scrub typhus rickettsiae. I. Inhibition of growth of *Rickettsia tsutsugamushi*, Karp strain, in cultured murine embryonic cells and macrophages by recombinant tumor necrosis factor-alpha. Microbiol. Immunol. 38, 703-711 (1994)
66. Walker, D. H., Popov, V. L., Crocquet-Valdes, P. A., Welsh, C. J., and Feng, H. M.: Cytokine-induced, nitric oxide-dependent, intracellular anti-rickettsial activity of mouse endothelial cells. Lab. Invest. 76, 129-138 (1997)
67. Rich, K. A., Burkett, C., and Webste, P.: Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. Cell Microbiol. 5, 455-468 (2003)
68. Yamaguchi, N., Hasegawa, T., Tamura, A., and Urakami, H.: Morphological analysis of growth inhibition of *Rickettsia tsutsugamushi* by tetracycline, chloramphenicol and erythromycin. Niigata Prefectural Hosp. Med. Bul. 32, 38-40 (1984)
69. Howe, D., Barrows, L. F., Lindstrom, N. M., and Heinzen, R. A.: Nitric oxide inhibits *Coxiella burnetii* replication and parasitophorous vacuole maturation. Infect. Immun. 70, 5140-5147 (2002)
70. Park, J., and Rikihisa, Y.: L-arginine-dependent killing of intracellular *Ehrlichia risticii* by macrophages treated with gamma interferon. Infect. Immun. 60, 3504-3508 (1992)
71. Boockvar, K. S., Granger, D. L., Poston, R. M., Maybodi, M., Washington, M. K., Hibbs, J. B. Jr., and Kurlander, R. L.: Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. Infect. Immun. 62, 1089-1100 (1994)
72. Croen, K. D.: Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. J. Clin. Invest. 91, 2446-2452 (1993)
73. van Furth, R., van Zwet, T. L., Buisman, A. M., and van Dissel, J. T.: Anti-tumor necrosis factor antibodies inhibit the influx of granulocytes and monocytes into an inflammatory exudate and enhance the growth of *Listeria monocytogenes* in various organs. J. Infect. Dis. 170, 234-237 (1994)

74. Svanborg, C., Godaly, G., and Hedlund, M.: Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. Curr. Opin. Microbiol. 2, 99-105 (1999)
75. Cho, H., Lasco, T. M., Allen, S. S., Yoshimura, T., and McMurray, D. N.: Recombinant guinea pig tumor necrosis factor alpha stimulates the expression of interleukin-12 and the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth in macrophages. Infect. Immun. 73, 1367-1376 (2005)
76. Kemp, K., Hviid, L., Kharazmi, A., and Kemp, M.: Interferon-gamma production by human T cells and natural killer cells in vitro in response to antigens from the two intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Leishmania major*. Scand. J. Immunol. 46, 495-499 (1997)
77. Ladel, C. H., Blum, C., and Kaufmann, S. H.: Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes. Infect. Immun. 64, 1744-1749 (1996)
78. Carlin, J. M, and Weller, J. B.: Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. Infect. Immun. 63, 1870-1875 (1995)
79. Sarmento, A., and Appelberg, R.: Involvement of reactive oxygen intermediates in tumor necrosis factor alpha-dependent bacteriostasis of *Mycobacterium avium*. Infect. Immun. 64, 3224-3230 (1996)
80. Thomas, S. M., Garrity, L. F., Brandt, C. R., Schobert, C. S., Feng, G. S., Taylor, M. W., Carlin, J. M., and Byrne, G. I.: IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. J. Immunol. 150, 5529-5534 (1993)
81. MacKenzie, C. R., Hadding, U., and Daubener, W.: Interferon- gamma- induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. J. Infect. Dis. 178, 875-878 (1998)
82. Jerrells, T. R., and Geng, P.: The role of tumor necrosis factor in host defense against scrub typhus rickettsiae. II. Differential induction of tumor necrosis

factor-alpha production by *Rickettsia tsutsugamushi* and *Rickettsia conorii*. Microbiol. Immunol. 38, 713-719 (1994)

83. Kim, M. K., and Kang, J. S.: *Orientia tsutsugamushi* suppresses the production of inflammatory cytokines induced by its own heat-stable component in murine macrophages. Microb. Pathog. 31, 145-150 (2001)
84. Ree, H. I., Kim, T. E., Lee, I. Y., Jeon, S. H., Hwang, U. W., Chang, W. H.: Determination and geographical distribution of *Orientia tsutsugamushi* serotypes in Korea by nested polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 528-534 (2001)
85. Wess, E., and Moulder, J. W.: Order I. *Rickettsiales*. In Krieg, N. R., and Holt, J. G. (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Boltimore/London 687-729 (1984)
86. Ohashi, N., Nashimoto, H., Ikeda, H., and Tamura, A.: Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. Sequence and comparative analyses of the genes encoding TSA homologues from four antigenic variants. J. Biol. Chem. 267, 12728-12735 (1992)
87. Tange, Y., Kanemitsu, N., and Kobayashi, Y.: Analysis of immunological characteristics of newly isolated strains of *Rickettsia tsutsugamushi* using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44, 371-381 (1991)
88. 山下照夫、粕谷志郎、長野功、大友弘士: 岐阜県における恙虫病の研究（第5報）標準株に対するモノクローナル抗体の性状と分離株の分類への応用. 感染症学雑誌 66, 1262-1269 (1992)
89. Furuya, Y., Yoshida, Y., Katayama, T., Yamamoto, S., and Kawamura, A. Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31, 1637-1640 (1993)
90. Kawamori, F., Akiyama, M., Sugieda, M., Kanda, T., Akahane, S., Yamamoto, S., Ohashi, N., and Tamura, A.: Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. J. Vet. Med. Sci. 55, 749-755 (1993)
91. Tamura, A., Makisaka, Y., Kadosaka, T., Enatsu, T., Okubo, K., Koyama, S., Qiang, Y., and Urakami, H.: Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from

Leptotrombidium fuji and its characterization, Microbiol. Immunol, 44, 201-204 (2000)

92. Tamura, A., Yamamoto, N., Koyama, S., Makisaka, Y., Takahashi, M., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Urakami, H. and Fukuhara, M.: Epidemiological survey of *Orientia tsutsugamushi* distribution in field rodents in Saitama Prefecture, Japan, and discovery of a new type. Microbiol. Immunol. 45, 439-446 (2001)
93. Shirai, A., Robinson, D. M., Brown, G. W., Gan, E., and Huxsoll, D. L.; Antigenic analysis by direct immunofluorescence of 114 isolates of *Rickettsia tsutsugamushi* recovered from febrile patients in rural Malaysia. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 32, 337-344 (1979)
94. Tamura, A., Ohashi, N., Koyama, Y., Fukuhara, M., Kawamori, F., Otsuru, M., Wu, P. F. and Lin, S. Y.: Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. FEMS Microbiol Lett. 150, 225-231 (1997)
95. Tamura, A., Makisaka, Y., Enatsu, T., Urakami, H., Okubo, K., Fukuhara, M. and Mahara, F.: Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from patients in Shikoku and finding of a strain which grows preferentially at low temperatures. Microbiol. Immunol. 43, 979-981 (1999)
96. Yamamoto, S., Kawabata, N., Ooura, K. Murata, M., and Minamishima, Y.: Antigenic types of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated from patients with Tsutsugamushi fever and their distribution in Miyazaki Prefecture. J. Japan Assoc. Infect. Dis. 63, 109-117 (1989)
97. Urakami, H., Takahashi, M., Misumi, H., Okubo, K., Enatsu, T., and Tamura, A.: Detection, isolation and characterization of *Orientia tsutsugamushi* in *Leptotrombidium intermedium*. Med. Entomol. Zool. 51, 169-177 (2000)
98. Lin, M., and Rikihisa, Y.: *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. Cell Microbiol. 6, 175-187 (2004)
99. Boland, A. and Cornelis, G. R.: Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. Infect. Immun. 66,

1878-1884 (1998)

100. Uehara, A., Sugawara, S., and Takada, H.: Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. J. Med. Microbiol. 51, 626-634 (2002)
101. Mendoza, F., Melendro, E. I., Baltazares, M., Banales, J. L., Ximenez, C., Chapela, R., and Selman, M.: Cellular immune response to fractionated avian antigens by peripheral blood mononuclear cells from patients with pigeon breeder's disease. J. Lab. Clin. Med. 127, 23-28 (1996)
102. Steinitz, M. and Tamir, S.: An improved method to create nitrocellulose particles suitable for the immobilization of antigen and antibody. J. Immunol. Methods 187, 171-177 (1995)
103. Abel, B., Thieblemont, N., Quesniaux, V. J., Brown, N., Mpagi, J., Miyake, K., Bihl, F., and Ryffel, B.: Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. J. Immunol. 169, 3155-3162 (2002)
104. Leveque, G., Forgetta, V., Morroll, S., Smith, A. L., Bumstead, N., Barrow, P., Loredo-Osti, J. C., Morgan, K., and Malo, D.: Allelic variation in *TLR4* is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. Infect. Immun. 71, 1116-1124 (2003)
105. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in *in vitro* responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 73, 352-361 (2005)
106. Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., and Erard, F.: Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. Infect. Immun. 72, 2131-2139 (2004)
107. O'Connell, R. M., Vaidya, S. A., Perry, A. K., Saha, S. K., Dempsey, P. W., and Cheng, G.: Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. J. Immunol. 174, 1602-1607 (2005)
108. Gervassi, A., Alderson, M. R., Suchland, R., Maisonneuve, J. F., Grabstein, K. H., and Probst, P.: Differential regulation of inflammatory cytokine secretion by

human dendritic cells upon *Chlamydia trachomatis* infection. Infect. Immun. 72, 7231-7239 (2004)

109. Ohashi, N., Tamura, A., and Suto, T.: Immunoblotting analysis of anti-rickettsial antibodies produced in patients of Tsutsugamushi disease. Microbiol. Immunol. 32, 1085-1092 (1988)

110. Niu, D., Chen, W., Zhang, X., Chen, M., Cui, H., Wei, W., Wen, B., and Chen, X.: Immunogenicity of a 40kDa fragment of the 47kDa recombinant protein and DNA vaccine from Karp strain of *Orientia tsutsugamushi*. Ann. N Y Acad. Sci. 990, 527-534 (2003)

111. Oaks, E. V., Rice, R. M., Kelly, D. J., and Stover, C. K.: Antigenic and genetic relatedness of eight *Rickettsia tsutsugamushi* antigens. Infect. Immun. 57, 3116-3122 (1989)

112. Yu, Y., Wen, B., Wen, B., Niu, D., Chen, M., and Qiu, L.: Induction of protective immunity against scrub typhus with a 56-kilodalton recombinant antigen fused with a 47-kilodalton antigen of *Orientia tsutsugamushi* Karp. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72, 458-464 (2005)

論文目録

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Fukuhara,M., Fukazawa,M., Tamura,A., Nakamura, T.and Urakami, H.: Survival of two *Orientia tsutsugamushi* bacterial strains that infect mouse macrophages with varying degrees of virulence. Microbial Pathogenesis 39, 177-187 (2005)
2. Tamura, A., Yamamoto, N., Koyama, S., Makisaka, Y., Takahashi, M., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Urakami, H. and Fukuhara, M.: Epidemiological survey of *Orientia tsutsugamushi* distribution in field rodents in Saitama Prefecture, Japan, and discovery of a new type. Microbiol. Immunol. 45, 439-446 (2001)
3. Tamura, A., Makisaka, Y., Enatsu, T., Urakami, H., Okubo, K., Fukuhara, M. and Mahara, F.: Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from patients in Shikoku and finding of a strain which grows preferentially at low temperatures. Microbiol. Immunol. 43, 979-981 (1999)
4. Tamura, A., Ohashi, N., Koyama, Y., Fukuhara, M., Kawamori, F., Otsuru, M., Wu, P. F. and Lin, S. Y.: Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. FEMS Microbiol Lett. 150, 225-231 (1997)
5. Ohashi, N., Koyama, Y., Urakami, H., Fukuhara, M., Tamura, A., Kawamori, F., Yamamoto, S., Kasuya, S. and Yoshimura, K.: Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. Microbiol. Immunol. 40, 627-638 (1996)
6. Ohashi, N., Fukuhara, M., Shimada, M. and Tamura, A.: Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiol. Lett. 125, 299-304 (1995)

参考論文目録

1. Rebets, Y., Ostash, B., Luzhetskyy, A., Kushnir, S., Fukuhara, M., Bechthold, A., Nashimoto, M., Nakamura, T. and Fedorenko, V.: DNA-binding activity of LndI

protein and temporal expression of the gene that upregulates landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912. Microbiology 151, 281-290 (2005)

2. Gromyko, O., Rebets, Y., Ostash, B., Luzhetskyy, A., Fukuhara, M., Bechthold, A., Nakamura, T. and Fedorenko, V.: Generation of *Streptomyces globisporus* SMY622 strain with increased landomycin E production and it's initial characterization. J. Antibiot. 57, 383-389 (2004)
3. Qiang, Y., Tamura, A., Urakami, H., Makisaka, Y., Koyama, S., Fukuhara, M. and Kadosaka, T.: Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. Microbiol. Immunol. 47, 577-583 (2003)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士・医学博士	山本友子
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	五十嵐一衛
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	堀江利治
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	医学博士	上田志朗
副査	千葉大学教授（医学研究院）	医学博士	野田公俊